

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA REZENDE PABST

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE HCG11 EM  
AMOSTRAS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA DOS SUBTIPOS  
LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO.**

CURITIBA

2018

FERNANDA REZENDE PABST

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE HCG11 EM  
AMOSTRAS TUMORAIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA DOS SUBTIPOS  
LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO.**

Trabalho apresentado à disciplina  
Trabalho de Conclusão de Curso II,  
do curso de Biomedicina, setor de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná, como parte das  
exigências para obtenção do título  
de bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Fiori  
Gradia

Coorientadora: Me. Carolina Mathias

CURITIBA

2018

Dedico este trabalho aos meus pais, Henrique e Hosana, porque sem eles eu não teria  
chegado até aqui. Devo tudo a vocês, muito obrigada por todo carinho e amor!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me dado força nos momentos mais difíceis e por ter guiado meu caminho até aqui.

Aos meus pais por todo o carinho e atenção que sempre me dedicaram. Cada palavra de incentivo, cada conselho e por terem sempre ouvido as minhas preocupações e anseios. Obrigada por serem o meu porto seguro!

Ao meu irmão que sempre ouviu as minhas histórias, que sempre me animou e falou que eu iria conseguir. Obrigada por todas as risadas e pela cumplicidade!

Às amigas que a faculdade me deu: Amanda, Gabriela, Heloize, Marina, Nicoli e Paula. Obrigada por cada conversa, por cada revisão para prova, por cada risada e por estarem sempre ao meu lado. São diversas histórias que ficarão guardadas para sempre na minha memória.

Às irmãs que o intercâmbio me presenteou. Carolina, Daisy, Lorena e Natasha, obrigada por terem cuidado de mim e terem sido minha família do outro lado do mundo.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Fiori Gradia, que sempre esteve presente para me auxiliar e me tranquilizar, sempre com um sorriso no rosto dizendo que tudo daria certo. Obrigada por me orientar e me ensinar tanto.

A minha coorientadora, Carolina Mathias, que sempre me auxiliou em todos os experimentos e sempre tirou as minhas dúvidas.

A todos do LabCHO por tudo que me ensinaram. Por serem sempre tão prestativos e fazerem com que o laboratório seja um excelente lugar para aprender e dar boas risadas.

À Universidade Federal do Paraná por cada segundo de aprendizado proporcionado em um ambiente que respira conhecimento.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Be fearless in the pursuit  
of what sets your soul on fire.”*

Jennifer Lee

## RESUMO

Mais de 1,5 milhão de mulheres são diagnosticadas anualmente com câncer de mama no mundo todo. A malignidade mamária é a mais incidente e com a maior taxa de mortalidade entre as mulheres, representando 15% das mortes por câncer entre as mulheres. A neoplasia da mama pode ser classificada tanto pelo seu perfil histológico, quanto imunoistoquímico ou molecular. A classificação imunoistoquímica é bastante utilizada na clínica e subdivide os tumores mamários em Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido e triplo negativo. Essa subdivisão é realizada através do perfil dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e do receptor de crescimento epidermal 2 (HER2). Somente os marcadores utilizados na classificação imunoistoquímica não são suficientes para determinar a diferença de prognóstico e resposta terapêutica apresentada pelos pacientes dentro do mesmo subtipo. Assim, buscam-se por novos biomarcadores que possam ser utilizados no manejo clínico desses pacientes. A busca por novos biomarcadores e também a necessidade de melhor entender a fisiopatologia de cada subtipo não se limita apenas aos genes codificantes de proteínas. Por exemplo, os RNAs longos não codificantes vêm demonstrando que apresentam grande significado biológico em neoplasias, sendo associados com os processos de carcinogênese, progressão tumoral, metástase, proliferação celular, evasão da apoptose e o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos. Nesse contexto, foi observado que o lncRNA *HLA Complex Group 11* (HCG11) apresenta expressão alterada em diferentes neoplasias, como o carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, tumores de pulmão de células escamosas e melanomas cutâneos. No câncer de mama, foi observado, através de análises *in silico* com dados obtidos do *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, que a superexpressão de HCG11 em pacientes com câncer de mama está correlacionada com um menor tempo de sobrevida. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do lncRNA HCG11 em amostras tumorais de pacientes diagnosticadas com câncer de mama nos subtipos Luminal A e triplo negativo. Para isto, foram utilizadas 23 amostras tumorais do subtipo Luminal A e 18 amostras triplo negativas. A análise de expressão do lncRNA HCG11 foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR). A análise da expressão relativa foi calculada pelo método do  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  e comparada aos parâmetros clínicos histopatológicos das amostras utilizadas. Foi observado que pacientes com o subtipo triplo negativo apresentam maiores níveis de expressão do HCG11 quando comparados com pacientes Luminal A. Foi observada também uma associação entre os níveis de expressão desta molécula com o grau do tumor, sendo que tumores de grau III apresentavam maior expressão do HCG11. Estes resultados indicam que a expressão diferencial do HCG11 pode estar relacionada à maior agressividade e pior prognóstico observados em pacientes triplo negativos. Além disso, esta molécula pode ser um novo biomarcador de prognóstico e diagnóstico para essas pacientes, bem como um possível alvo terapêutico no tratamento de pacientes triplo negativos.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; RNAs longos não codificantes; HCG11.

## ABSTRACT

More than 1.5 million women are diagnosed annually with breast cancer worldwide. Breast malignancy is the most frequent diagnosed and has the highest mortality rate among women, accounting for 15% of cancer deaths among women. Breast neoplasm can be classified either by its histological, immunohistochemical or molecular profile. The immunohistochemical classification is widely used in clinic and subdivides the tumors into Luminal A, Luminal B, HER2-enriched and triple negative. This classification is performed considering the status of the estrogen (ER), progesterone (PR) and epidermal growth receptor 2 (HER2) receptors. Only these markers used in the immunohistochemical classification are not able to determine the difference in prognosis and therapeutic response presented by the patients within the same subtype. Thus, new biomarkers are sought that can be used in the clinical management of these patients. The search for new biomarkers and also the need to better understand the pathophysiology of each subtype is not limited to protein coding genes. For example, long non-coding RNAs have been shown to have great biological significance in the onset of neoplasms, being associated with the process of carcinogenesis, tumor progression, metastasis, cell proliferation, evasion of apoptosis and the development of resistance to chemotherapeutics. In this context, it was observed that HLA Complex Group 11 (HCG11) lncRNA presents altered expression in different neoplasms, such as hepatocellular carcinoma, prostate cancer, squamous cell lung tumors and cutaneous melanomas. In breast cancer, it was observed, through in silico analysis with data obtained from the The Cancer Genome Atlas (TCGA), that the overexpression of HCG11 in patients with breast cancer is correlated with a shorter survival time. Thus, the objective of this work was to evaluate the expression of lncRNA HCG11 in tumor samples from patients diagnosed with breast cancer of the Luminal A and triple negative subtypes. For this, 23 tumor samples of the Luminal A subtype and 18 triple negative samples were used. Expression analysis of HCG11 lncRNA was performed using the quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique. The analysis of the relative expression was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and compared with the histopathological clinical parameters of the samples used. It was observed that patients with the triple negative subtype present higher levels of HCG11. The grade of the tumor was associated with higher levels of expression of this molecule with, as grade III tumors presented greater expression of HCG11. These results indicate that the differential expression of HCG11 may be associated with the highest aggressiveness and worse prognosis observed in triple negative patients. In addition, this molecule may be a new prognostic and diagnostic biomarker for these patients, as well as a novel therapeutic target.

**Keywords:** Breast Cancer; long non-coding RNAs; HCG11.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - INCIDÊNCIA CÂNCER BRASIL 2018 .....	14
FIGURA 2 - HISTOLOGIA MAMÁRIA .....	17
FIGURA 3 - ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DOS RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES .....	24
FIGURA 4 - ESTRUTURAS TERCIÁRIAS DOS RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES. ....	25
FIGURA 5 - FUNÇÕES DOS RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES. ....	27
FIGURA 6 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO HCG11 ATRAVÉS DO MODELO DE PREDIÇÃO DA MÍNIMA ENERGIA LIVRE. ....	32
FIGURA 7 - COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DO NORAD E HCG11.....	33
FIGURA 8 - SEQUÊNCIA DO HCG11 .....	34
FIGURA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 NOS SUBTIPOS TUMORAIS LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO .....	43
FIGURA 10 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 EM RELAÇÃO AO TAMNHO DOS TUMORES DO SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO.....	45
FIGURA 11 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 ENTRE TUMORES COM GRAUS I E II E GRAU III.....	46
FIGURA 12 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 EM CARCINOMAS DUCTAIS E LOBULARES DE PACIENTES COM SUBTIPO LUMINAL A .....	47
FIGURA 13 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 EM AMOSTRAS TRIPLO NEGATIVAS SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO NEOADJUVANTE.....	48



## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESQUEMA DE TRATAMENTO EM DIFERENTES SUBTIPOS DO CÂNCER DE MAMA .....	22
QUADRO 2 – SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA RT-qPCR .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*BRCA1* – gene breast cancer 1  
*BRCA2* – gene breast cancer 2  
cDNA - DNA complementar  
CpG – Nucleotídeo C seguido de G  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfato  
EGFR – do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*  
*et al.* – e colaboradores, do latim *et ali*  
HER2 - Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2  
INCA – Instituto Nacional de Câncer  
Ki-67 – Marcador de proliferação celular  
lncRNA - RNA longo não codificante, do inglês *long non-coding RNA*  
n – Tamanho amostral  
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*  
ncRNA– RNA não codificante  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ORF – do inglês *Open Reading Frame*  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
RE – Receptor de estrogênio  
RNA – Ácido ribonucléico  
RP – Receptor de progesterona  
RT-PCR – Técnica de Transcrição reversa seguida por PCR  
RT-qPCR – Técnica Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa  
TP53 – do inglês *Tumor protein 53*  
UFPR – Universidade Federal do Paraná  
UTR – Região não traduzida, do inglês *Untranslated Region*

## LISTA DE SÍMBOLOS

μl	microlitro
ng	nanograma
nt	nucleotídeo
pb	pares de bases

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
2.1	CÂNCER .....	14
2.2	CÂNCER DE MAMA .....	16
2.3	RNAs NÃO CODIFICANTES .....	23
2.3.1	RNAs longos não codificantes.....	23
2.3.2	RNAs longos não codificantes e Câncer de Mama .....	29
2.3.3	HCG11 .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	40
4.2	EXTRAÇÃO RNA.....	40
4.3	SÍNTESE DE cDNA .....	41
4.4	RT-qPCR.....	41
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o mais incidente e também a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres no mundo (BRAY *et al.*, 2018). A neoplasia mamária é extremamente heterogênea, apresenta diferentes características morfológicas, bem como diferentes potenciais metastáticos e respostas terapêuticas. Devido a sua heterogeneidade, os tumores de mama são subdivididos de acordo com seu perfil histológico, imunoistoquímico e/ou de acordo com a expressão de diferentes marcadores moleculares (EROLES *et al.*, 2012).

Os RNAs não codificantes são moléculas chave em diversos processos celulares, como, por exemplo, na diferenciação celular e organogênese (FATICA; BOZZONI, 2013; SATPATHY; CHANG, 2015) e no controle da expressão gênica (KHALIL *et al.*, 2009). Diversos estudos vêm mostrando que a desregulação da expressão destas moléculas afeta a homeostase celular e pode estar associada com o processo de tumorigênese (SANA *et al.*, 2012). A grande relevância dos RNAs longos não codificantes (lncRNAs) se deve ao fato dessas moléculas regularem a expressão de diversos genes, e também devido ao fato de serem tecido-específicas; fazendo com que distúrbios na sua expressão alterem o ambiente celular (QUINN; CHANG, 2016).

O lncRNA HCG11 (*HLA Complex Group 11*) está localizado no cromossomo 6p22.2 e apresenta 5.696 nucleotídeos. A expressão diferencial desse lncRNA já foi associada com diferentes cânceres, como o carcinoma hepatocelular (XU *et al.*, 2017), câncer de próstata (ZHANG *et al.*, 2016), tumores de pulmão de células escamosas (HUANG *et al.*, 2017) e melanomas cutâneos (XU *et al.*, 2018). No câncer de mama, foi observado, através de análises *in silico* com dados obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que a superexpressão de HCG11 em pacientes com câncer de mama está correlacionado com um menor tempo de sobrevida (LIU *et al.*, 2016).

Dessa maneira, o objetivo desse estudo é avaliar o perfil de expressão do lncRNA HCG11 no câncer de mama nos subtipos Luminal A e triplo negativo em amostras de pacientes brasileiras. Adicionalmente, analisar se a expressão desse lncRNA está associada com os dados clínicos e histopatológicos dos tumores utilizados, a fim de determinar se a expressão diferencial dessas moléculas pode estar relacionada com fatores diagnósticos ou prognósticos.

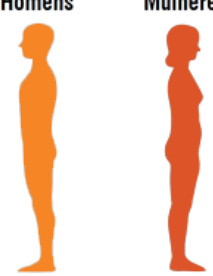
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células anormais, nas quais são observadas mutações em genes essenciais no controle do ciclo celular. É a segunda causa de morte no mundo, sendo responsável por 8,8 milhões de mortes no ano de 2015 (OMS, 2018). Para o ano de 2018, são estimadas 9,6 milhões de mortes decorrentes da doença (BRAY *et al.*, 2018)

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no biênio 2018-2019, são esperados 600 mil novos casos de câncer para cada ano. A Figura 1 mostra a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2018 por sexo, excetuando os casos de câncer de pele não melanoma.

FIGURA 1- INCIDÊNCIA CÂNCER BRASIL 2018.

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

LEGENDA: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2018 por sexo, exceto câncer de pele não-melanoma.

FONTE: INCA, 2018

Para que haja o desenvolvimento tumoral é necessário que diferentes mecanismos sejam alterados no ambiente celular. A sinalização para proliferação sustentada, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, ativação da imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase são consideradas as alterações mais importantes para o surgimento, progressão e invasão tumoral. Essas características foram definidas por Hanahan e Weinberg (2000) como os *Hallmarks of Cancer* e são os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos no estabelecimento e progressão do câncer. Em uma nova

revisão da literatura, esses mesmos autores incluíram a evasão do sistema imune, desregulação do metabolismo energético celular, instabilidade genômica e mutação, e inflamação como novas características que favorecem a sobrevivência tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

O surgimento de células cancerosas pode ser resultado de fatores epigenéticos, ambientais e/ou genéticos. Os fatores epigenéticos incluem alterações no perfil de metilação do DNA, no código das histonas e no perfil de expressão de RNA não codificantes que atuam diretamente no DNA, causando alterações na expressão de diferentes genes (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; LUKONG, 2017).

Além disso, fatores ambientais como dieta pobre em frutas e vegetais, sedentarismo, tabagismo e consumo de álcool foram listados como importantes agentes que podem levar ao aparecimento de neoplasias (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Dentre os fatores genéticos, mutações que geram perda de função em genes supressores de tumor ou mutações que promovem ganho de função em proto-oncogenes são processos chaves no desenvolvimento do câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

Um exemplo de gene supressor de tumor é o gene *TP53*, que codifica para a proteína p53. Essa proteína atua controlando a apoptose e progressão do ciclo celular. A proteína responde a sinais de estresse celular e dano ao DNA e caso esse dano seja irreparável, ocorre a sinalização para a célula entrar em apoptose. Quando ocorre uma mutação e a proteína p53 perde a sua função, esse controle é perdido, o dano não é reparado e a célula não sendo eliminada retoma o ciclo celular, acumulando mutações (LAKHANI *et al.*, 2002).

## 2.2 CÂNCER DE MAMA

São esperados, aproximadamente, 2,1 milhões de novos casos de câncer de mama no ano de 2018 no mundo todo (GLOBOCAN, 2018). Excluindo-se os casos de câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o tipo mais incidente entre as mulheres, representando aproximadamente 25% dos novos casos de neoplasia em pacientes do sexo feminino (FERLAY *et al.*, 2014). A incidência no Brasil é similar ao observado ao redor do mundo, e para o ano de 2018 são estimados 59.700 novos casos da doença (INCA, 2018).

Segundo levantamentos do GLOBOCAN 2018, a neoplasia mamária também será principal causa de morte por câncer entre mulheres no ano de 2018. No ano de 2012, foram observadas 520.000 mortes por câncer de mama no mundo (FERLAY *et al.*, 2014).

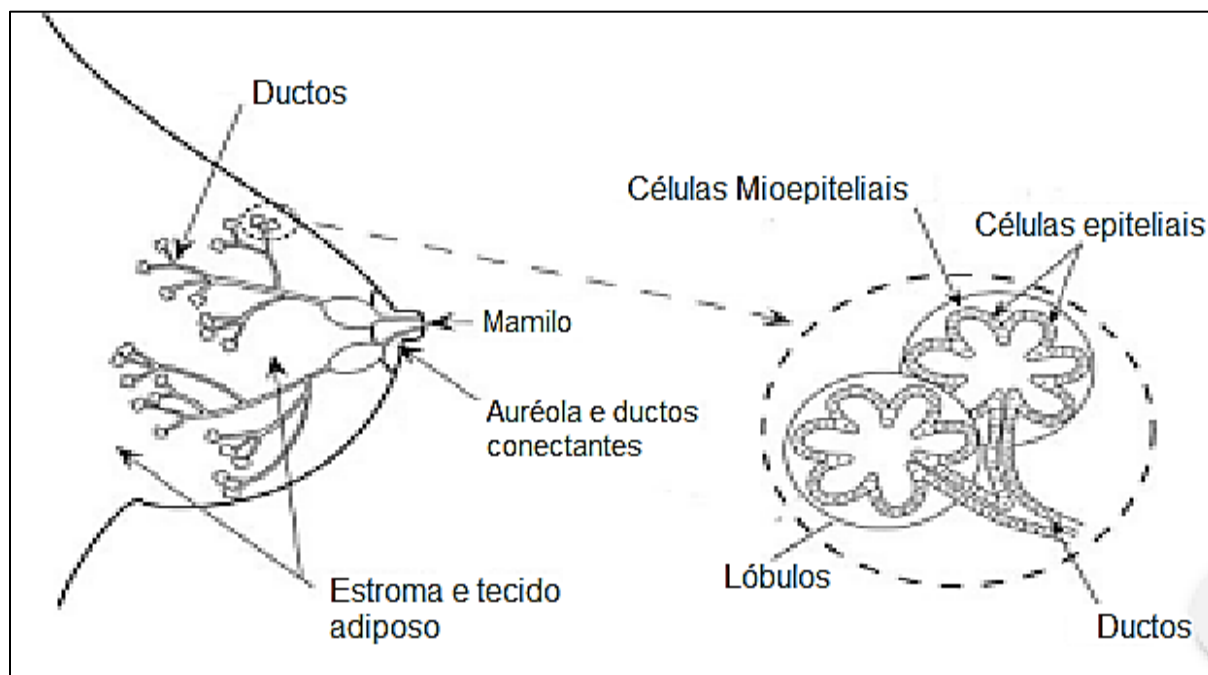
A taxa de cura da doença é alta quando diagnosticada em estágio inicial; entretanto, esse percentual cai drasticamente quando a doença é descoberta em estágios mais avançados (PARSA *et al.*, 2016). Comparativamente com os países desenvolvidos, os países subdesenvolvidos apresentam uma menor incidência da doença e uma maior taxa de mortalidade (LUKONG, 2017). Isto está diretamente relacionado com a precariedade de recursos de imagem e de métodos diagnósticos nos países subdesenvolvidos, que dificultam o diagnóstico precoce da doença resultando em um aumento no número de mortes. Além disso, o alto custo das terapias dificulta o tratamento adequado de milhares de pessoas nos países subdesenvolvidos (BECKER, 2015; PARSA *et al.*, 2016).

A glândula mamária apresenta duas estruturas principais; os ductos e os lóbulos. Essas estruturas são formadas pelas células epiteliais lumbais e mioepiteliais que compõem o estroma mamário (HONDERMARCK, 2003; GEDDES, 2007) (FIGURA 2). Estes dois tipos de células podem ser distinguidos através de testes imunoistoquímicos; células mioepiteliais (ou epiteliais basais) são coradas com anticorpos para queratina 5 e 6, enquanto células epiteliais lumbais são coradas com anticorpos para queratinas 8 e 18. A principal função da mama é nutrir e fornecer proteção imunológica ao lactante, mas também tem papel cultural, social e sexual. A mama é um órgão alvo de vários hormônios e frente a diferentes estímulos; como a menarca, gravidez, amamentação, e



menopausa, a mama pode sofrer inúmeras mudanças fisiológicas, como por exemplo, aumento dos ductos durante a gestação e amamentação (BECKER *et al.*, 2015; LUKONG, 2017).

FIGURA 2- HISTOLOGIA MAMÁRIA.



FONTE: Adaptado de HONDERMARCK (2003).

Os fatores que predisõem para o desenvolvimento do câncer de mama são variados e podem contribuir diferentemente para a manifestação da patologia. A idade avançada é considerada o principal fator de risco, devido ao acúmulo de várias mutações ao longo da vida, à diminuição da capacidade do sistema imune observada em indivíduos idosos, mas também ao maior tempo de exposição a hormônios estrogênicos (BALDUCCI *et al.*, 2005; IVKOVIC-KAPICL *et al.*, 2006). Além disso, os fatores de riscos genéticos, comportamentais e endócrinos também foram correlacionados à malignidade mamária, e contribuem para o aparecimento de tumores malignos (INCA, 2018; PRENTICE *et al.*, 2006).

Os fatores genéticos englobam principalmente mutações em genes importantes para o controle do ciclo celular e de reparo ao DNA; como por exemplo, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são extremamente relevantes no câncer de mama. Estes genes são supressores de tumor e participam de diferentes processos na célula,

atuando no controle do ciclo celular, remodelamento da cromatina e na ubiquitinação de proteínas (LAKHANI *et al.*, 2002).

Assim como em outros cânceres, a obesidade (TORIO *et al.*, 2010), consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo e o sedentarismo são listados como os principais fatores comportamentais associados com o surgimento do carcinoma mamário (INCA, 2018).

Os fatores endócrinos estão relacionados com o tempo e intensidade de exposição a hormônios estrogênicos; que considera a menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez depois dos 30 anos, nuliparidade, uso de contraceptivos orais e reposição hormonal após a menopausa como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (GONZÁLEZ-JÍMENEZ *et al.*, 2013).

A doença apresenta diferentes características morfológicas, potenciais metastáticos, respostas terapêuticas, e taxas de sobrevida. Um dos critérios utilizados para determinação do prognóstico e escolha do tratamento é a determinação do grau histológico do tumor, através da classificação TNM. Esta classificação avalia três fatores: o tamanho do tumor, se há ou não invasão dos linfonodos adjacentes e a presença ou não de metástase à distância. Estes fatores permitem classificar o tumor em grau I, II, III ou IV; e quanto maior o grau, mais agressivo é o tumor e pior o seu prognóstico (VAN VEER *et al.*, 2002).

Além do estadiamento, também é realizada a classificação histológica, molecular ou imunoistoquímica do tumor. A classificação histológica subdivide os tumores de acordo com as células de origem; considerando se as células provêm do epitélio lobular ou epitélio ductal. Além disso, essa classificação divide as neoplasias em invasivas ou *in situ*. Neoplasias invasivas já ultrapassaram a membrana basal epitelial e não estão mais contidas apenas no epitélio da mama, enquanto que carcinomas *in situ* ainda não romperam a membrana basal e estão localizadas apenas no epitélio mamário (LUKONG, 2017).

A classificação molecular é baseada na análise de expressão em larga escala de muitos genes, realizada através de microarranjos. Esta classificação subdivide os tumores mamários em os tumores em Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido, *Basal-Like*, *Normal-Like*, Claudina Baixo e Apócrino Molecular (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003; PRAT *et al.*, 2010). Apesar do avanço de tecnologias

que permitem a ampla análise do perfil genético dos tumores e da diminuição nos custos para a realização de análises como os microarranjos, a classificação molecular tem um custo elevado e ainda não é utilizada rotineiramente na prática clínica (EROLES *et al.*, 2012).

A classificação imunoistoquímica é bastante utilizada no contexto clínico e avalia a expressão dos tumores em relação a expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e avaliam os tumores que apresentam superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2) (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011). Além de avaliar a expressão destes receptores, a classificação imunoistoquímica determina a expressão do marcador de proliferação celular, Ki-67. Ao avaliar esses marcadores, essa classificação determina os seguintes subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido e triplo negativo (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

O subtipo Luminal A é o mais prevalente, representando 50 a 60% dos casos de câncer de mama. Esse subtipo expressa os receptores de estrogênio e progesterona, mas não apresenta superexpressão de HER2 (RE+, RP+ E HER2-) e apresenta baixa taxa de proliferação com expressão de Ki-67 menor que 14% (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013). Os tumores desse subtipo apresentam baixo grau histológico. Pacientes do subtipo Luminal A apresentam melhor prognóstico e maior tempo livre da doença, quando comparados com pacientes do subtipo triplo negativo e HER2-enriquecido (EROLES *et al.*, 2012).

Tumores do subtipo Luminal B representam de 20 a 30 % dos casos de câncer de mama. Comparativamente com os tumores do subtipo Luminal A, os tumores do subtipo Luminal B são mais agressivos, apresentam maior grau histológico, pior prognóstico e maior taxa de proliferação com Ki-67 maior que 14%. Tumores desse subtipo são positivos para os receptores de estrogênio, podem ser positivos ou negativos para os receptores de progesterona e podem ou não apresentar superexpressão do receptor HER2 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; EROLES *et al.*, 2012; GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

De 15 a 20% dos casos de neoplasias mamárias são do subtipo HER2-enriquecido, que é caracterizado pela alta expressão do gene *HER2*. Os tumores desse

subtipo apresentam elevada proliferação celular e alto grau histológico (EROLES *et al.*, 2012). Do ponto de vista clínico, os pacientes com esse subtipo apresentam prognóstico desfavorável. Entretanto, com o surgimento de terapias específicas com anticorpos monoclonais anti-HER2, a sobrevida aumentou substancialmente (EROLES *et al.*, 2012; LUKONG, 2017).

Os tumores triplo negativos não expressam os receptores de estrogênio e progesterona e apresentam níveis normais de expressão de HER2. Esse subtipo representa 10 a 20% dos casos de tumores de mama, e são normalmente carcinomas ductais invasivos com alto índice mitótico, necrose tumoral, alto grau histológico, e alta frequência de comprometimento dos linfonodos. O subtipo triplo negativo apresenta o pior prognóstico e maior capacidade invasiva e os pacientes apresentam menor tempo de sobrevida (EROLES *et al.*, 2012).

Os diferentes subtipos apresentam diferentes desfechos clínicos, tempos de sobrevida livre da doença e tempos de sobrevida total. O tratamento dos pacientes com neoplasias mamárias também é realizado tomando como base a classificação imunoistoquímica, levando em consideração o perfil dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, além de avaliar o grau de proliferação celular apresentado pelo tumor, através do índice Ki-67 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

Pacientes que apresentam tumores que expressam receptor de estrogênio são tratados, preferencialmente com terapia hormonal. O tratamento é realizado principalmente com tamoxifeno ou fulvestranto, que são antagonistas do receptor de estrogênio no tecido mamário. Em mulheres em pós-menopausa, tamoxifeno ou fulvestranto é administrado juntamente com inibidores da aromatase, que reduzem a síntese de estrogênio; como o anastrozol ou letrozol (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013; HAYES *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016).

Pacientes que apresentam superexpressão do receptor HER2 são tratadas com anticorpos monoclonais que se ligam no domínio extracelular desse receptor, uma vez que o receptor HER2 pertence à família dos receptores transmembrana de tirosina quinases. O *Trastuzumab* é o anticorpo mais utilizado no tratamento de pacientes HER2-enriquecido (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

Os medicamentos citotóxicos são utilizados para pacientes que apresentam tumores com alto grau de proliferação e também no tratamento de pacientes triplo negativos. Antraciclinas e taxanos são as classes mais utilizadas no tratamento desses pacientes (LI *et al.*, 2015; ZHENG, 2017).

As antraciclinas são antibióticos antitumorais. Um exemplo é a Doxorrubicina, que é um intercalante de DNA e inibe a síntese do DNA. Além disso, a doxorrubicina também aumenta a produção de radicais livres, gerando citotoxicidade. Os taxanos são drogas que interferem com moléculas do citoesqueleto, principalmente nas tubulinas. Os taxanos se ligam aos microtúbulos celulares e estabilizam essas moléculas, dificultando a despolimerização com íons de cálcio. Com o bloqueio dos microtúbulos, os cromossomos não formam o fuso equatorial observado durante a metáfase. Isto impede a progressão da mitose e a ativação dos pontos de checagem mitóticos, o que promove o disparo de sinais que encaminham a célula para apoptose. Paclitaxel e Docetaxel são os taxanos mais utilizados na clínica (LI *et al.*, 2015; ZHENG, 2017).

Apesar de não serem utilizados com tanta frequência, os agentes alquilantes do DNA e os quimioterápicos antifolato também são drogas citotóxicas usadas no tratamento de pacientes com câncer de mama. Os agentes alquilantes, como a cisplatina, carboplatina e ciclofosfamida, intercalam com o DNA e promovem danos que impedem a divisão celular. Já os quimioterápicos antifolato, tais como 5-Fluoracil, agem nas enzimas envolvidas na via do folato, essencial para síntese de DNA e divisão celular (CHEN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017).

O quadro 1 apresenta um modelo resumido do esquema de tratamento para pacientes com diferentes subtipos do câncer de mama.

QUADRO 1- ESQUEMA DE TRATAMENTO EM DIFERENTES SUBTIPOS DO CÂNCER DE MAMA.

Subtipo	Tipo de terapia
Luminal A	Terapia hormonal
Luminal B (HER2 negativo)	Terapia hormonal + Drogas citotóxicas
Luminal B (HER2 positivo)	Terapia hormonal + Anticorpo anti-HER2 + Drogas citotóxicas
HER2-enriquecido	Anticorpo anti-HER2 + Drogas citotóxicas
Triplo Negativo	Drogas citotóxicas

FONTE: Adaptado de Goldhirsch *et al.*, 2011.

Normalmente, os pacientes realizam os tratamentos com agentes quimioterápicos após a cirurgia de retirada do tumor. Entretanto, os pacientes podem ser submetidos a estes tratamentos mesmo antes da mastectomia, denominado terapia neoadjuvante. Foi observado que a administração de terapia neoadjuvante auxiliou na realização da cirurgia conservadora das mamas, além de melhorar o prognóstico desses pacientes. A escolha da terapia neoadjuvante deve ser feita do mesmo modo que é feita a seleção de tratamentos adjuvantes pós-operatórios (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

## 2.3 RNAs NÃO CODIFICANTES

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento, estudos de transcriptômica ressaltam a importância dos genes não codificadores de proteínas na diferenciação celular e sua função em diferentes estágios celulares (PANG *et al.*, 2006). Apenas 2% do genoma codificam para proteínas (LANDER *et al.*, 2012), enquanto que mais de 80% do genoma é transcrito em RNA funcionais (DJEALI *et al.*, 2012; KAPRANOV *et al.*, 2015)

RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas de RNA que não codificam para proteínas, sendo divididos em pequenos (<200 nucleotídeos) e longos (>200 nucleotídeos) RNAs. Os pequenos RNAs não codificantes, podem ser classificados em microRNAs (miRNAs), *Piwi-interacting* RNAs (piRNAs), RNAs curtos de interferência (siRNAs), entre outros (SANA *et al.*, 2012). Dentre essas moléculas, os microRNAs são os mais estudados e atuam como reguladores da expressão gênica. Estas moléculas também desempenham papel chave no processo carcinogênico em vários tipos de neoplasias e, conseqüentemente, são potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no câncer (THOMAS *et al.*, 2015; SCHWARZENBACHER *et al.*, 2013).

Por outro lado, os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) são menos caracterizados, em termos de estrutura e função, o que se deve principalmente à dificuldade em isolar moléculas muito grandes e pouco abundantes nas células (BLYTHE *et al.*, 2015). A dificuldade em elucidar a estrutura dessas moléculas está relacionada com o fato de RNAs apresentarem diferentes possibilidades de dobramentos secundários e terciários, mas também porque essas moléculas apresentam longas sequências, o que aumenta a chance de adquirirem uma conformação diferente da esperada (WAN *et al.*, 2012; CLARCK *et al.*, 2012).

### 2.3.1 RNAs longos não codificantes

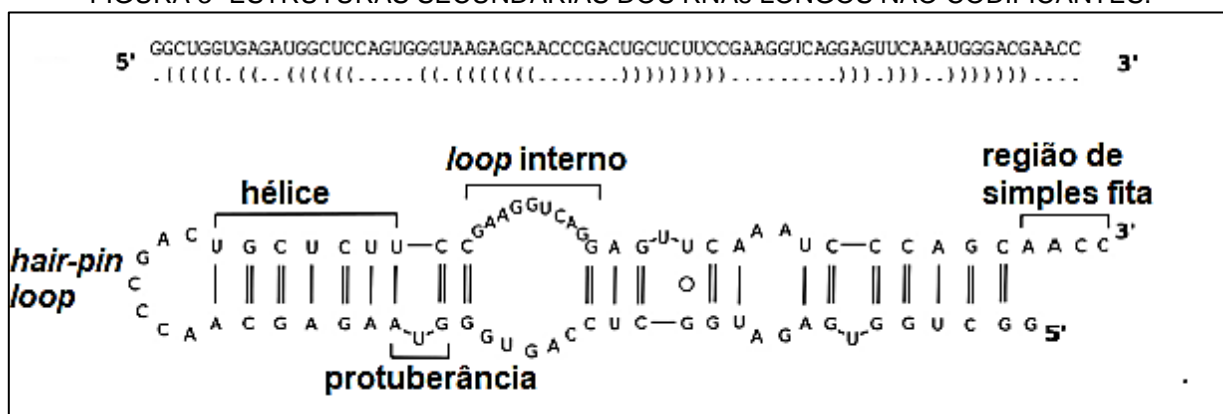
Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) são moléculas de RNA com mais de 200 nucleotídeos que não codificam proteínas. São encontrados principalmente no núcleo da célula, mas também podem estar localizados no meio citoplasmático (PONTING; OLIVER; REIK, 2009). Quando comparados aos RNA mensageiros (mRNAs), os lncRNAs apresentam poucos *éxons* e poucas ORFs (*open reading*

frames) (DERRIEN *et al.*, 2012). Os lncRNAs são essencialmente classificados de acordo com a sua posição genômica em relação a genes codificadores de proteínas; assim, são classificados como: *sense*, intergênicos, intrônicos, pseudogenes, transcritos com regiões ultraconservadas, ou antisenses (ST. LAURENT; WAHLESTEDT; KAPRANOV, 2015).

Similarmente ao processo de transcrição dos mRNAs, os lncRNAs também são transcritos pela RNA polimerase II, podem apresentar modificações pós transcricionais, como a adição de “*capping*” de metilguanossina na terminação 5’ e poliadenilação na terminação 3’; ou sofrer o processo de *splicing* (DERRIEN *et al.*, 2012; PONTING; OLIVER; REIK, 2009; QUINN; CHANG, 2016).

A estrutura dos lncRNAs ainda não está completamente esclarecida, mas sabe-se que estas moléculas apresentam diversas estruturas secundárias e terciárias; extremamente importantes para a interação desses RNAs com proteínas e outros ácidos nucleicos (WAN *et al.*, 2012; CLARCK *et al.* 2012). Dentre as estruturas secundárias, os lncRNAs apresentam *hairpin loops*, hélices, *loops* internos, protuberâncias e regiões de simples fita (FIGURA 3). As estruturas terciárias compreendem as tripla-hélices, pseudonós, *kissing loops* e *tetraloops* (FIGURA 4) (NOVIKOVA *et al.*, 2012; THEIMER *et al.*, 2005).

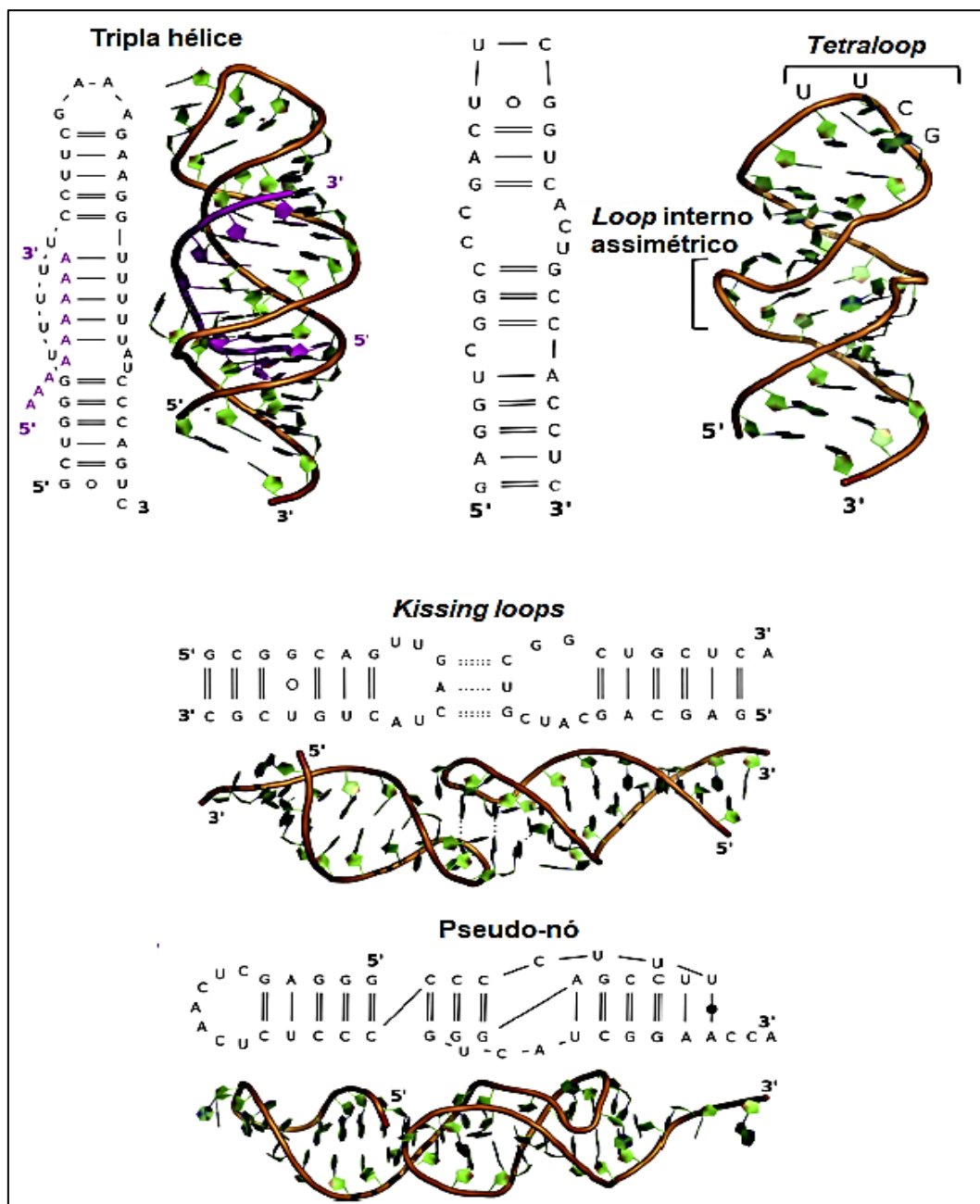
FIGURA 3- ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DOS RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES.



FONTE: Adaptado de BLYTHE *et al.*(2015).



FIGURA 4- ESTRUTURAS TERCIÁRIAS DOS RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES.



FONTE: Adaptado de BLYTHE et al.(2015).

Devido à alta complexidade estrutural que podem assumir, estas moléculas apresentam um nível de versatilidade e complexidade similar ao observado em proteínas (BLYTHE *et al.*, 2015). A estrutura dos lncRNAs é alterada dependendo com quais moléculas eles estão interagindo. Já foi observado que os lncRNAs apresentam um grande número de sítios ligantes de proteínas, o que permite que atuem como plataformas para a formação de unidades funcionais protéicas complexas (LEEPER; VARANI, 2005; DUSZCZYK *et al.*, 2011).

Os lncRNAs podem agir em *cis*, atuando na regulação da expressão de genes próximos ao seu local de síntese; ou em *trans*, regulando a expressão de genes localizados em outras regiões do genoma. Já foram descritos diferentes mecanismos de ação dos lncRNAs. Alguns desempenham sua função ao modificar a estrutura da cromatina (TSAI *et al.*, 2010); ao atuar no *imprinting* genômico (MERCER *et al.*, 2013); ao promover a inativação do cromossomo X (KAWAKAMI *et al.*, 2004), ao alterar a atividade transcricional de diferentes genes (KHALIL *et al.*, 2009); ou ao interferir nas etapas de tradução, processamento e na estabilidade dos mRNAs (TRIPATHI *et al.*, 2010) (FIGURA 5).

Ao atuarem no processo de remodelamento da cromatina, e recrutarem complexos modificadores de cromatina, os lncRNAs afetam diretamente o processo de transcrição gênica (TSAI *et al.*, 2010). Os lncRNAs também podem interferir com o recrutamento e a atividade de DNA metiltransferases e, desse modo, modular a metilação de dinucleotídeos CpG e, desse modo, promover alterações na expressão gênica (LAW; JACOBSEN, 2010).

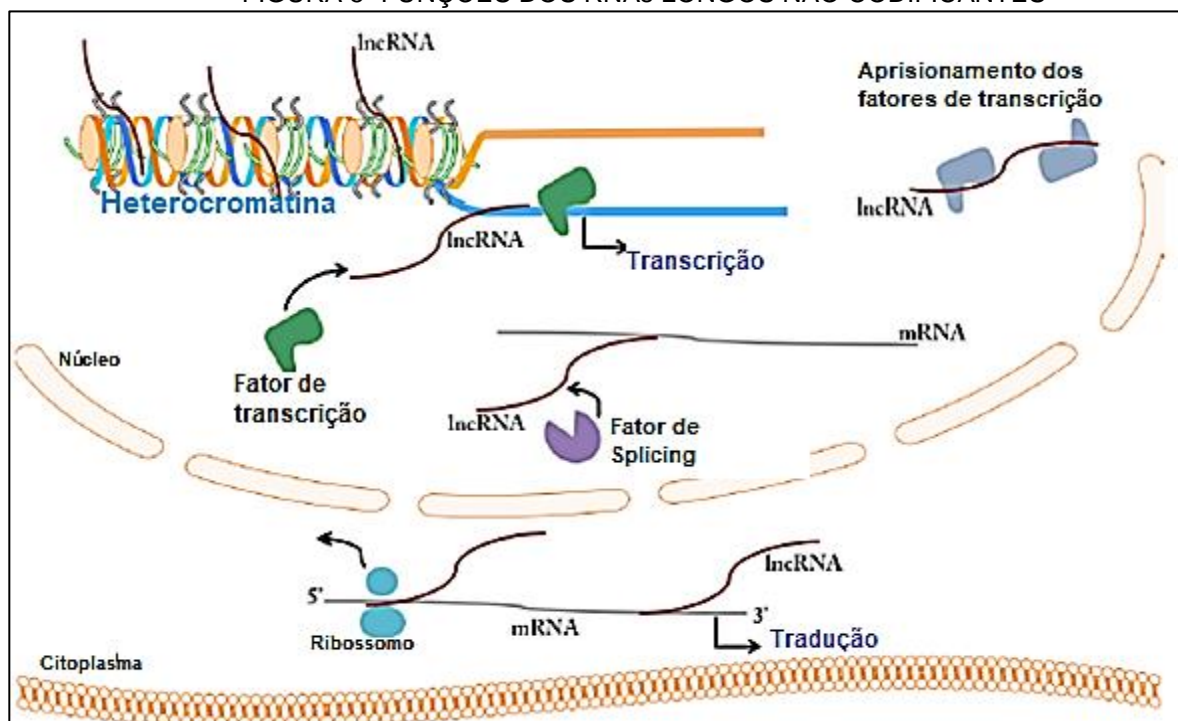
Quando intervêm no processo de transcrição, os lncRNAs atuam sequestrando ou alterando a localização celular de fatores de transcrição, competindo com o sítio de ligação ao DNA ou até mesmo interferindo diretamente na atividade da RNA Polimerase II. De outro modo, o processo de transcrição dos lncRNAs pode regular a transcrição gênica. Isto porque o processo de transcrição do lncRNA estabiliza os domínios da cromatina e permite que ocorram as modificações de histonas necessárias para ativar a transcrição de genes próximos ou *antisense* (WANG *et al.*, 2011).

Além dos processos desempenhados no núcleo da célula, os lncRNAs também atuam no citoplasma e modulam a atividade e a abundância de proteínas e mRNAs

(BLYTHE *et al.*, 2015). Os lncRNAs também interferem com a estabilidade dos mRNAs. Os lncRNAs atuam inibindo a degradação dos mRNAs, pois ao interagirem com essas moléculas eles previnem que a maquinaria de degradação se ligue aos mRNAs e os degrade. Além disso, os lncRNAs atuam como competidores endógenos de microRNAs e, dessa forma, impedem a repressão da tradução dos mRNAs. Adicionalmente, os lncRNAs recrutam fatores que desestabilizam os mRNAs e aumentam a taxa de degradação destes ácidos nucleicos (KUNG *et al.*, 2013).

O processo de tradução de mRNAs é modulado pelos lncRNAs através de diferentes mecanismos; como por exemplo, através da competição pelo sítio de ligação do mRNA na maquinaria de tradução (WANG *et al.*, 2011).

FIGURA 5- FUNÇÕES DOS RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES



LEGENDA: Os lncRNAs regulam a expressão gênica através da condensação da cromatina, por ativar ou inibir a transcrição do DNA, por influenciar no *splicing* dos mRNA, por interferir com a estabilidade dos mRNA, ou por ativar ou inibir a tradução dos mRNA em proteínas.

FONTE: Adaptado de SILVA *et al.*(2015)

Foi observado que a expressão dos lncRNAs em diferentes tecidos do organismo é importante para inúmeros processos biológicos, incluindo diferenciação celular/organogênese (PAULI, A.; RINN, J.; SCHIER, 2011; FATICA; BOZZONI, 2013), desenvolvimento neuronal (KUNG *et al.*, 2013) e modulação do sistema imune

(HEWARD; LINDSAY, 2014). Apesar de muitos lncRNAs apresentarem sua função biológica conservada entre diferentes espécies, estudos de sequenciamento completo do transcriptoma (RNA-seq) demonstraram que 81% dos lncRNAs não têm sua sequência de DNA conservada. Contudo, a região promotora dos lncRNAs é mais conservada do que a dos genes codificantes de proteínas; indicando a importância da regulação da expressão destas moléculas (DERRIEN *et al.*, 2012).

Desta maneira, os lncRNAs surgiram como reguladores essenciais em praticamente todos os aspectos da biologia (KIM *et al.*, 2016). Além disso, estas moléculas apresentam uma especificidade tecidual maior do que a observada por outros RNAs, tornando-as interessantes candidatos para biomarcadores diagnósticos e alvos terapêuticos (SILVA *et al.*, 2015; FANG; FULLWOOD, 2016).

De acordo com diferentes análises de expressão, é cada vez mais evidente que alterações nos níveis de expressão de vários lncRNAs estão correlacionadas com processos de desenvolvimento e estágios de doenças. Foi observada a expressão aberrante de RNAs longos não codificantes em várias doenças complexas (CIPOLLA *et al.*, 2018); como em doenças neurodegenerativas (PASTORI; WAHLESTEDT, 2012), doenças cardiovasculares (SCHONROCK; HARVEY; MATTICK, 2012), diabetes e obesidade (KIM *et al.*, 2016), e na biologia do câncer (TYE *et al.*, 2016).

A importância dos lncRNAs na carcinogênese está relacionada com a função desempenhada por essas moléculas nos processos de proliferação celular (TRIPATHI *et al.*, 2013), resistência à apoptose (PICKARD *et al.*, 2013), metástase (YING *et al.*, 2012), indução da angiogênese e evasão de supressores tumorais (NING *et al.*, 2016). Foi verificada alteração na expressão dos lncRNAs em diferentes tipos de cânceres; como o câncer gástrico (MA *et al.*, 2016), câncer de mama (VIKRAM *et al.*, 2014), câncer de pulmão (SCHMIDT *et al.*, 2011), próstata (PICKARD *et al.*, 2013) e hepatocarcinoma (PENG; FAN, 2015).

Um dos exemplos de lncRNA associados ao câncer é o lncRNA HOTAIR (*HOX antisense intergenic RNA*), que está localizado no cromossomo 12q13.13 e apresenta em torno de 2.200 nucleotídeos. Já foi observado que esse lncRNA está superexpresso em cânceres de pulmão e mama e está associado com a invasão, progressão, metástase e pior prognóstico dos pacientes (VIKRAM *et al.*, 2014).

### 2.3.2 lncRNAs e Câncer de Mama

O lncRNA MALAT-1 (*Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) está localizado no cromossomo 11q13 e contém 8.000 nucleotídeos (CERK *et al.*, 2016). Este lncRNA foi primeiramente descoberto no câncer de pulmão, mas já foi observado que ele está superexpresso em outros tipos de cânceres, incluindo o câncer de mama (CERK *et al.*, 2016), câncer cervical (ZHANG *et al.*, 2015) e câncer de pulmão de células não pequenas (SCHMIDT *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2018) demonstraram a superexpressão do MALAT-1 em tumores de mama, o que também foi correlacionado com os processos de metástase, proliferação celular e migração.

Foi observado que tumores de mama apresentam expressão aumentada do lncRNA HOTAIR, além de estar associado com invasão e metástase nos carcinomas mamários. Esta molécula interage com complexo metiltransferase PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) e causa o silenciamento de diversos genes através de modificações nas histonas (GUTTMAN *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Li *et al.* (2016), foi evidenciado que tumores de mama apresentam maior expressão do lncRNA TUG1 (*Taurine Upregulated Gene 1*). Além disso, os autores observaram que maiores níveis de TUG1 estão associados com o tamanho do tumor, a presença de metástases e o grau do tumor. Assim como em tecidos tumorais, foi observada a maior expressão de TUG1 em linhagens celulares invasivas, como as triplo negativas, MDA-MB 231 e MDA-MB-436, quando comparadas com linhagens menos agressivas, como as luminais A, MCF-7 e T47D. Ensaios funcionais com linhagens celulares, indicaram que o silenciamento de TUG1 resultou na diminuição da proliferação celular, supressão de invasão e migração, aumento na taxa de apoptose, e também aumento na atividade da caspase 3 e caspase 9, enzimas envolvidas com o processo de apoptose.

Através de análises *in silico*, com dados do TCGA, foi demonstrado que a expressão do lncRNA TUG1 não é uniforme em amostras tumorais de mama. Os subtipos HER2-enriquecido e *basal-like* apresentam maiores níveis de expressão de TUG1, quando comparados com o subtipo Luminal A. Além disso, dentre os pacientes

do subtipo HER2-enriquecido, a maior expressão de TUG1 foi associada com maior tempo de sobrevida dos pacientes (GRADIA et al., 2017).

Os lncRNAs também já foram associados com o desenvolvimento de resistência à terapia com várias drogas em pacientes com câncer de mama. Zhu et al. (2018) verificaram que células resistentes ao anticorpo monoclonal *trastuzumab* expressam níveis mais elevados do lncRNA UCA1 (*Urothelial Cancer Associated 1*). O silenciamento do lncRNA UCA1 foi capaz de restabelecer a sensibilidade ao *trastuzumab*, uma vez que foi observado aumento da apoptose, redução da viabilidade celular e invasão. Os autores propuseram que o UCA1 atua como uma esponja para o miR18a. Observou-se que níveis mais elevados de microRNA estavam ligados a níveis mais baixos de proteína YAP1 e CDK6 e níveis mais elevados de PTEN. Níveis reduzidos de YAP1, um regulador transcricional, foi capaz de restabelecer a sensibilidade celular ao tratamento com *trastuzumab* (ZHU et al., 2018).

Em células tumorais de mama, o lncRNA-ROR (*Regulator of Reprogramming*) foi associado com a transição epitélio-mesênquima (TEM) e o aumento da sua expressão promoveu menor sensibilidade às drogas quimioterápicas 5-Fluorouracil (5-FU) e paclitaxel, com aumento concomitante de marcadores TEM, como maior expressão de N-caderina e Vimentina e também menor expressão de E-caderina. A inibição do lncROR produziu uma melhor resposta ao tratamento com Paclitaxel e 5-FU, mas também reduziu os marcadores de TEM (CHEN et al., 2015).

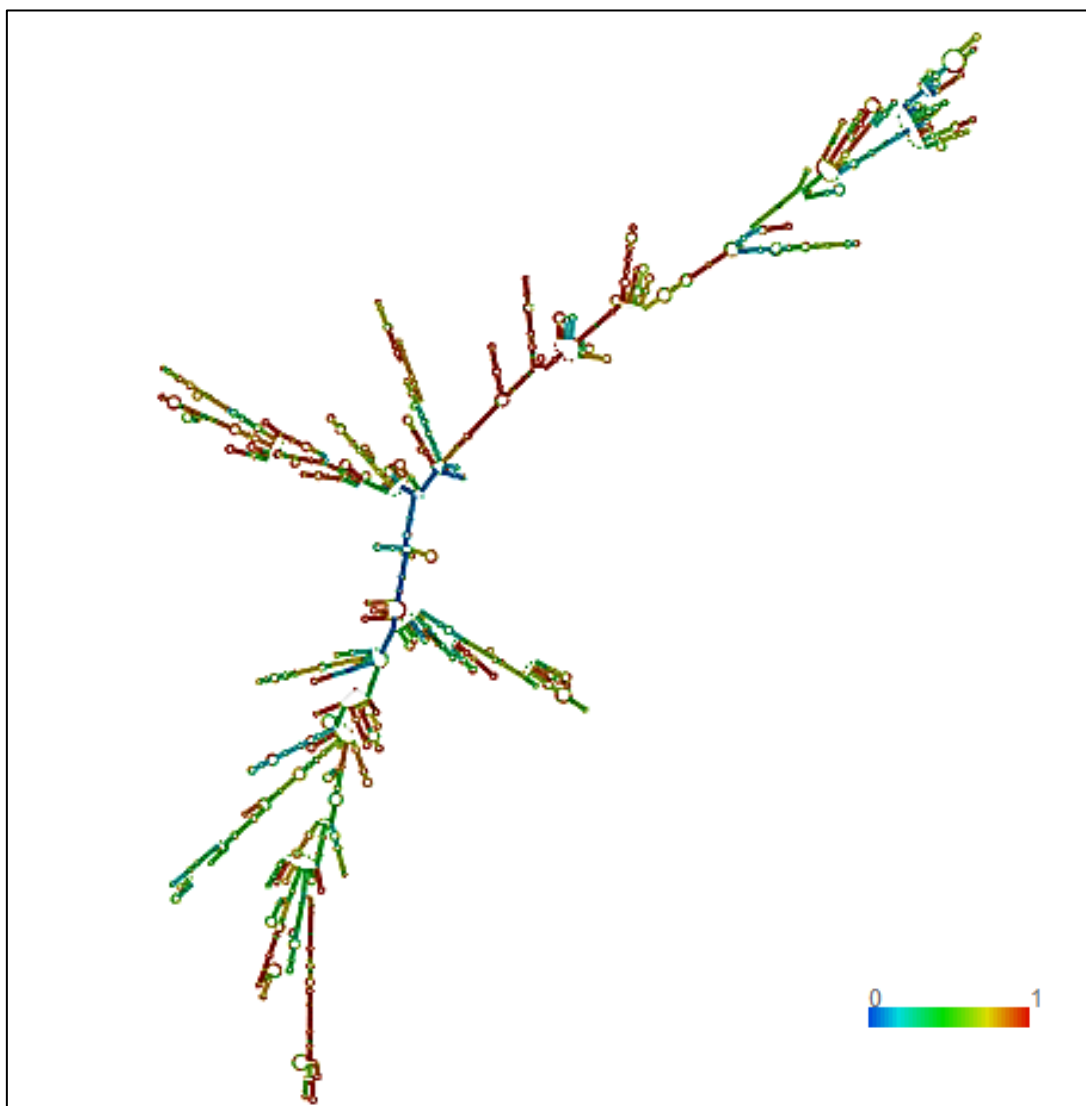
Li et al. (2017) sugeriram que a expressão de lncRNA CRALA (*chemoresistance-associated lncRNA*) poderia ser usada como um biomarcador para resistência ao Paclitaxel e à Cisplatina em pacientes com câncer de mama. Pacientes que desenvolveram resistência à quimioterapia expressavam altos níveis de CRALA. Além disso, o CRALA é regulado positivamente em linhagens de células de câncer de mama resistentes à quimioterapia e a inibição do CRALA foi capaz de restabelecer a sensibilidade ao Paclitaxel e à Cisplatina.

### 2.3.3 HLA Complex Group 11 (HCG11)

O lncRNA HCG11 (*HLA Complex Group 11*) está localizado no cromossomo 6p22.2, apresenta 5.696 nucleotídeos e apenas 1 *éxon*, codificado na fita 5'→3' (*forward strand*). A localização celular desta molécula pode ser tanto nuclear quanto citoplasmática (TICHON *et al.*, 2016). Nas linhagens celulares GM12878 e IMR90, o HCG11 se encontra no citoplasma celular. Já nas linhagens K562 e HUVEC, ele é expresso no núcleo e no citoplasma, enquanto que na linhagem HeLa-S3, ele é encontrado apenas no núcleo da célula. Não foi detectada expressão do HCG11 na linhagem MCF-7 (TICHON *et al.*, 2016).

A estrutura do HCG11 ainda não foi estabelecida, entretanto, com base em modelos computacionais de predição de estrutura secundária de RNAs, o HCG11 pode ter sua estrutura similar ao demonstrado na Figura 6. Através do modelo de predição de energia livre mínima, é possível que o HCG11 apresente em sua estrutura *hairpin loops*, *loops* internos e regiões de hélice. A estrutura prevista teria energia livre de -1760,40 kcal/mol (RNAfold WebServer).

FIGURA 6 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO HCG11 ATRAVÉS DO MODELO DE PREDIÇÃO DA MÍNIMA ENERGIA LIVRE.



LEGENDA: São observados diferentes motivos na estrutura secundária do HCG11, como *hairpin loops*, *loops* internos e regiões de hélice. A escala de cores indica a probabilidade de o pareamento de bases previsto estar correto, quanto mais perto de 1 maior a chance de acerto.

FONTE: RNAfold WebServer,

<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=vB942wUNBC>

O HCG11 é considerado um pseudogene do lncRNA NORAD (*non-coding RNA activated by DNA damage*) e apresenta 91% de similaridade com a sequência do NORAD (FIGURA 7). O lncRNA NORAD está localizado no cromossomo

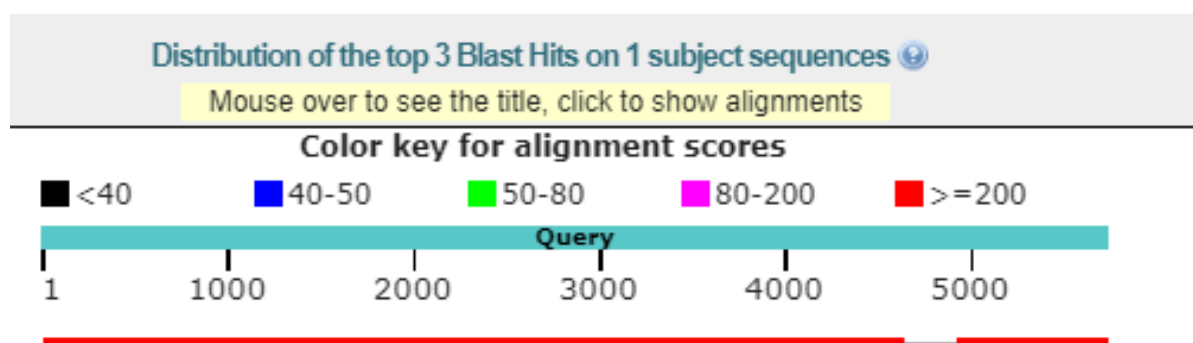


20q11.23, contém 5.339 nucleotídeos, apenas 1 éxon, na fita 3' → 5' (*reverse strand*) e está localizado preferencialmente no citoplasma celular (TICHON *et al.*, 2016).

Tanto NORAD quanto HCG11 são lncRNAs poliadenilados e seus genes parecem ser transcritos a partir de promotores derivados de longas repetições terminais de retrovírus endógenos (BOHN *et al.*, 2017). Entretanto, a expressão do HCG11 é aproximadamente 200 vezes menor do que o lncRNA NORAD (TICHON *et al.*, 2016).

FIGURA 7 - COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DO NORAD E HCG11.

A)



B)

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
6024	7125	94%	0.0	91%	Query_88995

LEGENDA: a) Score de alinhamento entre as sequências do NORAD e HCG11, considerando 3 regiões de pareamento. b) Estão demonstrados os dados do pareamento obtido. Indicando a similaridade de 91% entre as sequências avaliadas e 94% de cobertura no pareamento realizado.

FONTE: Nucleotide Blast - NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

O lncRNA HCG11 contém 16 sequências conservadas de ligação às proteínas da família PUMILIO, PUM1 e PUM2 (FIGURA 8). Similarmente, o lncRNA NORAD apresenta 17 sequências de ligação com as proteínas PUMILIO. Embora a função molecular do HCG11 seja desconhecida, o NORAD foi proposto em atuar como um

inibidor competitivo de PUMs, mediado por seus muitos elementos de resposta a Pumilio (PREs) (LEE *et al.*, 2016; BOHN *et al.*, 2017).

FIGURA 8 - SEQUÊNCIA DO HCG11.

```

1  cactgcaaga gttccggtct ggccagagagc gccgagagac gcagagcgcg ggccgctcct
61  ccagggcgct ccagggccctc cggccccggg tcggcgggtg agctagggggg cgccccggga
121 caggccgcgc cctctgccct gcagataacc gaggcctctg ctgtggctgc ccactggctg
181 ggcccaggcc ttgaagcggg ggccgaacgtc tcttccctac cctacctcgg tgactgatgg
241 cggcggcggc ctctcccagt ccggaccctg ccggccgtcg ggtctcccgg cccaagcctg
301 ccgggccttg acgaaacccc cgccgagcag cctggacgca gcgcctttgg gtggcggcgg
361 gagtagcgtg ccgggaagca tggcggccgc tcgaacgccg ccggcgggag ggccgttaggg
421 catggagggc ccgggaaggc ggccctagggg ccgaggcagg ctccggccgc tcttcaggcc
481 acggagccgc cagatctggg tcccgggtga ccactctgtc gccattgggc gagacctacc
541 tagtcctaac gacaacggac aaaggcctta acgggccttg gaggtgagcg aagtcccgaa
601 cgacgacggg tggaaagggt agcggcgatc ggccgggttg tctccgtact accagacctt
661 gctgtcggaa gagacaaatg gtagaatgac aggccacgtt tggcccgctt gaaatgccct
721 ccattcctct ggaaagattc caggccgttt acggaaggcc tgggtatata atatgaaaaa
781 gctgctctca actccacccc aaccttttaa tagaaaacat ttgtcacatc tagcccttct
841 agatggaaaag aggttgccga cgtatgatag agttagaaag tcacacatct tgtaaatctt
901 catttgttta aaagaaatca tagaaaatac atgtcttccg gagttgactt ttggaaactg
961 agttgttaga cggcctctag aagcgatacg ttcacgtttg ttcagtgggt tagatgacat
1021 ggagctcgaa gacctgagaa ggaaaaaaag aaggttctat gctagactgg tcatatttag
1081 aagacatttt catattctat ccattgtttt gtgtgcattc gcttctcac tactatgtat
1141 gtagttgaca atgctaagct tttttgaaat gtctattctt tttagatatt ctgaagtgtc
1201 tgatatatgt taaaattaga gtagtaaaaa ccacattttg taaatatctt tttgttacaa
1261 ttcatagaaa tgttgttttt tgggggggaat ggccaaatca cctgttgagt aatactcatt
1321 gtgtttgtgc agtagttcag gggaggagag agggaggggg ggtgcagaga gctctatgcc
1381 atcctgctta cagcgaggca agatgaatca ctatgtctgt gcattttgtt ttatctatgt
1441 atataatgta cataaaggac aaacgagtc taatttacaa catctagtct ttctggatgt
1501 taaagagggt gccagtgtat aacaaaacta gagttagtaa actaatatat tttgtacatt
1561 ttgttttaca agtcctagga aagactgtct tctgaaaatt tgagcattct tgcccactgg
1621 gttgatggag atgggaaggg ttctaggcca gaatgttcac atttggaaga ctctttcaaa
1681 ttataactgt tgttacatgt ttgcagttta ttcgagactg ctgtgtacat acatagtgga
1741 caaattaact cttacttga aacattttag ctatctagat gtttagaagt gcccgatgta
1801 tattaataat agaggtagta aaataccaat ttgtaaatat ctttttgcta aaattcatag
1861 gaaatacttt tggaaagtga attgtgaagc cacccttgtg agcagtatat tactgtctat
1921 acttgcctca tggtttagag gaggtgggag ggaagaaatt gcaaaagata atatgctagt
1981 gtgttcatac ttggacattt tcagacacca tttttctgta tgttttgtgc attttgttt
2041 gctctgtata tagtgtatat aatggacaaa tagtcttaat tttttaacat ctagagggtg
2101 ccagtgtatg acaaagtagt aaaattagca tattttgtat gctttgtgtt gaaattcata
2161 ggaaaacttg tcttctgtaa ttgacttttg cataggaatt tgttcagcca tctctaagca

```

2221 ttacacatgc gtgtacttgt ccactgaatt gaaggcagag aaggaagaga agaggggaatg  
 2281 attcaaggcc aaaatgggtca catttagaag ataccttaga tgataacccat tgttatgtgt  
 2341 gtgcagtttt atttaacagt gccgtgtaca tgggtggacag gctatgaaat atctagtcct  
 2401 tagatatttg gaagtgttg atgtatttta aagtagtagt agtagaataa cactttttgt  
 2461 aaatagcttt taaaaactga tgggaaatgc tgtttggaag tggatttgtt gaaccacctg  
 2521 ggagggtggga gggaaaaaat tgcaaaagggt gttttgccat tgtttattag aaaatttcag  
 2581 cttaatccat tgcctatatg ttacaagcat ttcatttaac tttgctatac tgtatatatt  
 2641 gtgtatatatc tggacaaatg agtcctgatt ttataatatc tagtctgtag ctattaaaga  
 2701 gggtgccagt gtatgacaaa agtagttagt aaactaacgc attttgtaca ctttgttaaa  
 2761 attcatagag aggctgtcct ctgaaaagga ctttttggaa gtgaaatgat aacatcagct  
 2821 cgaagtgaca catgtgttta tatccaccag gttggtggtg gagaggagt ggaagggaatg  
 2881 aagggttcta gaccagaatg ttcctattta gaagacactt tcagatataa ccattgttac  
 2941 atgtgtgtag tttattcaac agtgctaagt atatagtgga cacacttaag tccttatttg  
 3001 aaatatctag tctttctaga tgtttagaag tgcacaaagc atgttaaaag tagaggtagt  
 3061 aagtaacaca tttttagatt attttgatat gaaatattgt cttggaaatt gatcaattct  
 3121 ctgagaagta cacgttatga tatttgtgct gggtcagggg gaagaaggag cacaaagttc  
 3181 aaagggtctt ctaccagtgt ccagtgtgtt tatgatgagg cacattgacc attgtccctt  
 3241 atgtctgcat tttcgtttac tgtgctgtgt atataagcag acataggagt cctaatttat  
 3301 atctagtcca tgtaaaagag gttgccagt tatggcaaaa gtagagttag taaactaata  
 3361 cattgagtac actttgtgtt aaaattcata aggaacactt cttaaaaaca gaagtaaaat  
 3421 tgtaaaacgc cccccgccc caagcattac agatggctta tagctgtcaa cggggttggg  
 3481 agaggtcaga aagggaagtg ttctaggcca gaatgttcct atttagaaga cactcaaat  
 3541 atagtctatg ttagttatat atgccattta ttcaatacta ctgtgtatat aatggaaaac  
 3601 ttaagtgcag tttgaaacat ctagtctttc taggtgttta aaagtgcaca atggtcaggt  
 3661 gcggtggctc actcctgtaa tcctggcact ttgggaggct gaggtgggca gatcacgaag  
 3721 tcaagggatc gagactatct tggccaacat ggtgaaacc catctctaca aaaaatacaa  
 3781 aaattagctg gtcgtggtgg cacatgcctg tagtcccagc tactcgggag gctgaggcag  
 3841 gagaatcgct tgagcccggt agacagaggt tgcagtaagc cgagaccaca ccactgcact  
 3901 ccagcatggc gacagagcaa gactccatct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aattccacaa  
 3961 catagggttaa aagtagaggg ctaaagtaac acccctctaa gcatttgttt tcagtacttc  
 4021 ctaggagtgg ttgcatttgg gaatggaatt gttaaaactt gatgcttagg agcgtatgct  
 4081 gactattcac tgcgtggtgg ggtggggagg aggaggaggt atgcaggag aagggttctg  
 4141 tgcccctgag ttagattagt tcagatggct taaccattgt tctatgtatg cattttattg  
 4201 tgtaaatatt gtgtattaaa ggataaacaa gtcttaatgc tcaaagtatg ttaaaaatag  
 4261 atgtagtgaa tcagtccctt tgtgaatgtc ctattgttag tttttaggaa ggcctgtctt  
 4321 ctgggagtga cttttattag tccacttctt ggagctagac gtcctatact tagtcactgg  
 4381 ggatggtgaa agaggagaa gaggaagggc gaagggaagg gctctttgct agtatctcca  
 4441 tttctagaag atggttttag atgataacca caggctctata tgagcatttt tagtaaatg

```

4501 cctgtgttta ttgtggacag agtttattat tttgcaacat ctaaccttta tgaatatctg
4561 aggtgacaat gtgtgataaa aactagagct agtgggccag gcgcggtggc tcatgcctgt
4621 aatcccaaca ttttgggagg ctgaggcagg cagatcacaa ggtcaagaga tcgagaccat
4681 cctgggtcaac atggtgaaac cccatctcta ctaaaaatac aaaaattagc tgggcgtggt
4741 ggcgctgcc ttagtccca gcttctcagg aggctgaggc aggagaatca cttgaacctg
4801 ggaggcggag gttgcagtga gccaatattg cgccactgca ctccagcctg ggcaacacag
4861 caagactcca tctcaaaaaa aaaaaaacta gagctagtga attagccaat ttgtaaatac
4921 ctttttataa gtgatagaaa agatgcatct tggacatgga attgttaaac cgcctctgag
4981 cagtatatgt caggacttgt tcattagggt ggccagcagag gggcagaagg aagtatacag
5041 ggagagatgt atgcagatgt gtccatatgt gtccatattt acattttgat gatagccatt
5101 gatgtatgca tctcttttgg ctgtactata ggaatacatt aagtaattca atggaaatat
5161 accttgctaa tattataatg gtatagctct gttaatgaat tctcttagaa acattatact
5221 taatgtattc tgttgctgta tgtttcattt taattgagca ttaagggaat gcagcattta
5281 aatcagaact ctgccaatgc ttttatctag aggcgtgttg tcatttttgt cttctatgaa
5341 atttttgtcc caagaaagg aggactacat ttttttttaa cagattaagt tgggttagtg
5401 tattcttggt tatcaaaata ctaataaagc tttgggattt tgaattggta aatattcatg
5461 atgtgtcaaa aatcatgata catactgtac aatctcagtc ccataagatg ggatgttggt
5521 cctacacaca cacaggacct agaagaacat gtcaaactgt aaactgcttg tgattgtgaa
5581 tgactttgtt gtttgcttct tgtgattttc agtttcctat aatgcacata ttaacatatt
5641 aactttttta aataaagggt attttaaaag cctgtttaaa aaaaaaaa

```

LEGENDA: Em azul estão marcadas as sequências que são reconhecidas pelas proteínas PUMILIO.  
 FONTE: Nucleotide - NCBI, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR\\_026790.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_026790.1)

As proteínas da família PUMILIO estão envolvidas em diferentes vias de sinalização celular, em processos neuronais e de desenvolvimento, na comunicação célula-célula e de adesão celular. São proteínas que se ligam a RNAs (RBP) e agem como inibidores da expressão dos seus alvos. Elas se ligam em seus alvos preferencialmente na sequência UGUANAUA, que é a sequência do elemento de resposta a PUMILIO (PRE) (WANG *et al.*, 2002; GALGANO *et al.*, 2008).

PUM1 e PUM2 apresentam funções similares e diminuem a estabilidade dos mRNAs de seus alvos, e também interferem na tradução dessas moléculas em proteínas funcionais

Dentre os alvos de PUMILIO, estão os fatores de reparo do DNA, replicação do DNA, ciclo celular e reguladores da mitose. Por controlarem genes chave para a manutenção da homeostase celular, a atividade das proteínas PUMILIO deve ser precisamente controlada. Foi observado que tanto a hiperativação quanto a hipoativação destas proteínas estão relacionadas com a instabilidade genômica (LEE *et al.*, 2016).

PUM1 promoveu a inibição do gene supressor tumoral CDKN1B/p27, além de causar a inibição de alvos relacionados com a estabilidade genômica (KEDDE *et al.*,

2010). Entretanto, também foi demonstrado que a depleção de PUMILIO causou a proliferação celular e a superexpressão promoveu a inibição do fator de crescimento E2F3 (MILES *et al.*, 2012).

A função desempenhada pelo HCG11 no processo carcinogênico anda não foi completamente elucidada. Xu *et al.* (2017) observaram que o HCG11 tem sua expressão aumentada nos carcinomas hepatocelulares, quando comparados com os tecidos adjacentes não-tumorais. Além disso, os autores observaram que a expressão desse lncRNA está correlacionada com a expressão da proteína IGF2BP1 (do inglês *insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein*). Testes *in vitro* demonstraram que a inibição do HCG11 reduziu a expressão da proteína IGF2BP1, que é capaz de inibir proteínas da via de transdução de sinal MAPK. O bloqueio do lncRNA HCG11 foi capaz de induzir a apoptose, além de reduzir migração, proliferação, capacidade invasiva e a viabilidade celular da linhagem tumoral de carcinoma hepatocelular, HepG2. Esses efeitos foram justificados pelos níveis reduzidos de proteínas anti-apoptóticas, p-p38, p-ERK, p-JNK; mas também pelo aumento dos níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas, como p21 e caspase-3 clivada.

Através de análises *in silico* com dados obtidos do TCGA, Liu *et al.* (2016) observaram que superexpressão de HCG11 em pacientes com câncer de mama está correlacionado com um menor tempo de sobrevida. Além disso, os autores demonstraram que os níveis de expressão HCG11 estão associados significativamente com o subtipo triplo negativo e o *status* do receptor de estrogênio. Foi observado que dentre os tumores que apresentam superexpressão do HCG11, 60% são do subtipo triplo negativo. Por outro lado, dentre os tumores que não apresentam alteração na expressão do HCG11, 73% são positivos para o receptor de estrogênio.

Tumores de pulmão de células escamosas também apresentam menores níveis de expressão do HCG11, em comparação com tecidos não-tumorais (HUANG *et al.*, 2017).

Também foi observado que o lncRNA HCG11 está superexpresso nos melanomas cutâneos. Quando comparados o nível de expressão desta molécula em relação aos estágios do tumor, foi observado que tumores nos estágios I/II apresentam expressão do HCG11 3,05 vezes maior do que o estágio 0. Similarmente, tumores nos

estágios III/IV apresentam expressão do HCG11 3,26 vezes maior do que o estágio 0. Os autores observaram que o HCG11 interage com os microRNAs miR-106b-5p e miR-194-3p. Foi observado que a menor expressão do miR194-3p está correlacionada com metástase tumoral e o desfecho da doença (XU *et al.*,2018).

Em um estudo realizado por Zhang *et al.* (2016), foi analisada a expressão do lncRNA HCG11 em tumores de próstata, através de análises *in silico* e *in vivo*. A análise de bioinformática com os dados obtidos do TCGA indicou que amostras de tecido tumoral apresentam menor expressão do HCG11, quando comparadas com as amostras de tecido não-tumoral. Corroborando com os dados obtidos *in silico*, os autores demonstraram que amostras de tecido não-tumoral apresentam maior expressão de HCG11, quando comparadas com amostras tumorais.

Considerando a importância do HCG11 em diferentes neoplasias e também o fato da expressão diferencial dessa molécula ser tumor específica, o objetivo desse trabalho é avaliar se existe diferença na expressão do HCG11 nos subtipos Luminal A e triplo negativo, além de verificar se existe associação entre os níveis de HCG11 e os dados clínicos das pacientes desses subtipos do câncer de mama.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o nível de expressão do lncRNA HCG11 em tecidos tumorais de pacientes diagnosticadas com câncer de mama dos subtipos Luminal A e triplo negativo.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se existe diferença na expressão do lncRNA HCG11 em pacientes dos subtipos Luminal A e triplo negativo;
- Comparar os dados clínicos das pacientes com a expressão do lncRNA HCG11;
- Avaliar a expressão do HCG11 em pacientes triplo negativas submetidas a tratamento neoadjuvante;
- Avaliar a expressão do HCG11 em diferentes tipos histológicos no câncer de mama.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de tecido tumoral mamário foram obtidas durante procedimento cirúrgico no Hospital Nossa Senhora das Graças em Curitiba (PR). O presente estudo faz parte de um amplo projeto na área de genética dos tumores mamários, que vem sendo desenvolvido pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa: processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003. As pacientes participantes desse estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram utilizadas 23 amostras tumorais do subtipo Luminal A e 18 amostras do subtipo triplo negativo. Dentre as amostras do subtipo Luminal A, 6 eram carcinomas lobulares e 17 eram carcinomas ductais. Dentre as amostras triplo negativo, todas as amostras selecionadas eram carcinomas ductais. Considerando as amostras que receberam tratamento neoadjuvante, nenhuma das pacientes com o subtipo luminal A recebeu o tratamento prévio à cirurgia. Já entre as pacientes com o subtipo triplo negativo, 8 pacientes receberam tratamento neoadjuvante.

### 4.2 EXTRAÇÃO RNA

A extração de RNA dos tumores sólidos foi realizada com o kit de extração RNeasy® QIAGEN seguindo as orientações do fabricante. Foram utilizados 0,03g de amostra, a qual foram adicionados 600 µl de tampão RLT, contendo isotiocianato de guanidina. Após a lise do material, a amostra foi centrifugada durante 3 minutos a 20.000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com a adição de 600 µl de etanol 70%. A amostra foi transferida para uma coluna com filtro e centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e a coluna lavada com 350 µl de RW1, contendo sal de guanidina, seguido de centrifugação por 15 segundos a 8.000 xg. Após a centrifugação, foram adicionados 80 µl de DNAase (1U/ µl) e tampão de DNAase durante 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com 350 µl de RW1 e posteriormente lavadas duas vezes com 500 µl de



tampão RPE, contendo etanol. O RNA foi eluído com 30 µl de água dietilpolicarbonato (DEPC). A concentração de RNA das amostras foi medida em aparelho *Nanodrop Spectrophotometer* 2000 (ThermoScientific).

#### 4.3 SÍNTESE DE cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi produzido com o kit High Capacity RNA to cDNAcreator® (AppliedBiosystems), em um volume total de 20 µl. Foram adicionados 1000 ng de RNA tratado com DNAase, 2 µl de tampão 10X, 1 µl de dNTPs (100mM), 1 µl de RandomPrimers 10X, 1 µl de Multiscribe (50U/µl), 0,5 µl de RNAase Out (40 U//µl) e 2 µl de água DEPC. A reação foi realizada em termociclador com a seguinte ciclagem: 5 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C, 10 minutos a 80°C e 1 hora a 4°C.

#### 4.4 RT-qPCR

A quantificação dos lncRNAs foi realizada através da técnica de RT-qPCR (*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*), com a utilização de agente fluorescente intercalante de DNA SybrGreen®. O complexo SybrGreen-DNA emite fluorescência a 535 nm, quando excitado com um comprimento de onda de 520 nm. Após a reação de amplificação, foi realizada a curva de dissociação para determinar a especificidade do produto amplificado. A análise da curva de dissociação foi realizada avaliando a temperatura de *melting* (TM) do produto amplificado.

A reação foi realizada em equipamento *ViiA7* (AppliedBiosystems), em placa de 96 poços. O volume final da reação foi de 10 µl por poço, sendo 5,0 µl de SYBR®GreenDye 2x, 4,5 de cDNA na concentração de 2 ng/ul e 0,5 µl da solução 10µM de primers *Forward* e *Reverse* (Quadro2). As amostras foram analisadas em duplicata técnica. O gene da Beta Glucuronidase (*GUS β*) foi utilizado como gene normalizador. Um *pool* de linhagens tumorais que expressam os genes de interesse foi utilizado como amostra calibradora. A reação foi realizada com a seguinte ciclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C de 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O cálculo da expressão relativa foi realizado utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

QUADRO 2- SEQUÊNCIA DOS PRIMERS UTILIZADOS NA RT-qPCR.

Primers	Sequências	Tamanho do fragmento amplificado
GUS $\beta$	5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA-3' 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3'	101pb
HCG11	5'-AGGAGTGGTTGCATTTGGGA-3' 5'-CCCACCACGCAGTGAATAG-3'	79 pb

FONTE: A autora (2018).

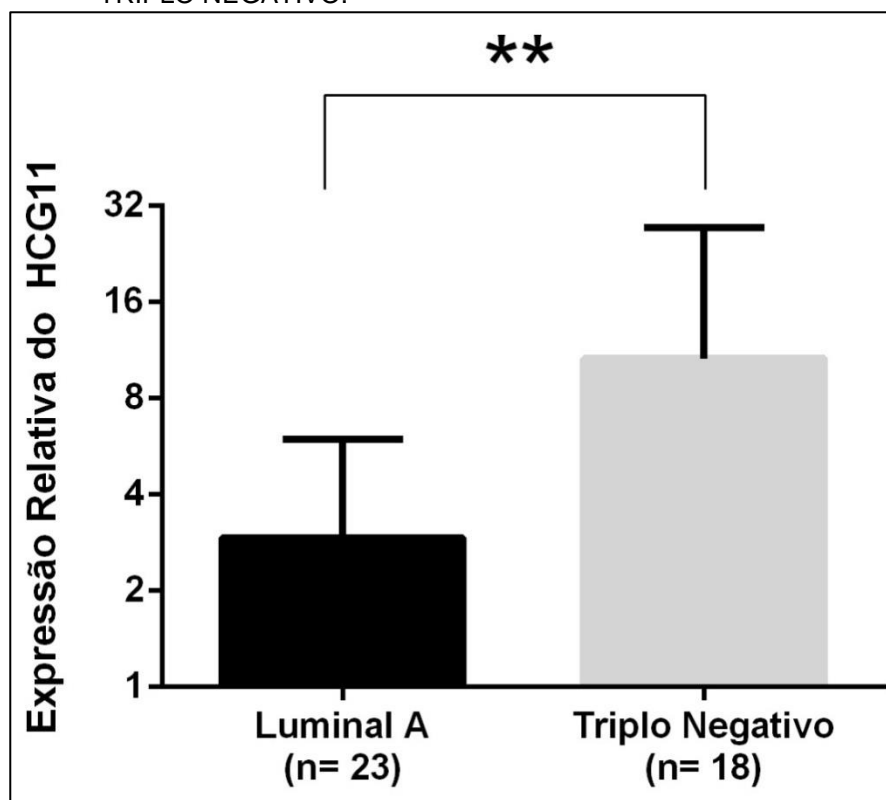
#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com as médias de expressão do HCG11 entre os subtipos tumorais analisados, bem como entre os parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes incluídas neste estudo. O valor de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

A expressão relativa do HCG11 entre os subtipos Luminal A e triplo negativo está demonstrada na Figura 9. Foi observado que o lncRNA HCG11 é significativamente mais expresso nos tumores do subtipo triplo negativo ( $p= 0,0007$ ), quando comparado com tumores do subtipo Luminal A. Tumores do subtipo Luminal A normalmente apresentam baixo grau histológico e são associados com um bom prognóstico. Em contrapartida, tumores do subtipo triplo negativo apresentam alto grau histológico e pior prognóstico. O aumento da expressão do lncRNA HCG11 no subtipo triplo negativo pode estar associado com o prognóstico clínico menos favorável e também com as diferenças clínicas observadas entre o subtipo Luminal A e triplo negativo.

FIGURA 9 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 NOS SUBTIPOS TUMORAIS LUMINAL A E TRIPLO NEGATIVO.



\*\* $p<0,001$

FONTE: A autora (2018).

A expressão relativa do HCG11 foi também avaliada em relação a diferentes parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes utilizadas no estudo. Através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, foi avaliado se havia diferença de expressão ao dividir as pacientes em diferentes grupos. As pacientes foram estratificadas levando em consideração idade, mais ou menos de 50 anos; presença ou não de metástase nos linfonodos axilares; tamanho e grau do tumor.

Quando comparados os dados de expressão entre todas as pacientes analisadas, não houve diferença significativa da expressão do HCG11 entre pacientes com menos de 50 anos em relação ao grupo com mais de 50 anos ( $p= 0,352$ ). Também não foi observada diferença estatisticamente significativa quando a análise de idade foi realizada dentro das amostras luminais A ( $p= 0,257$ ) e dentro das amostras triplo negativas ( $p= 0,232$ ).

Em relação a presença ou não de metástase em linfonodos axilares, não foi evidenciada diferença estatística na expressão do HCG11 ( $p= 0,5$ ). Também não foi observada diferença estatística quando a análise de metástase em linfonodos axilares foi realizada dentro das amostras luminais A ( $p= 0,917$ ) e dentro das amostras triplo negativas ( $p= 0,187$ ).

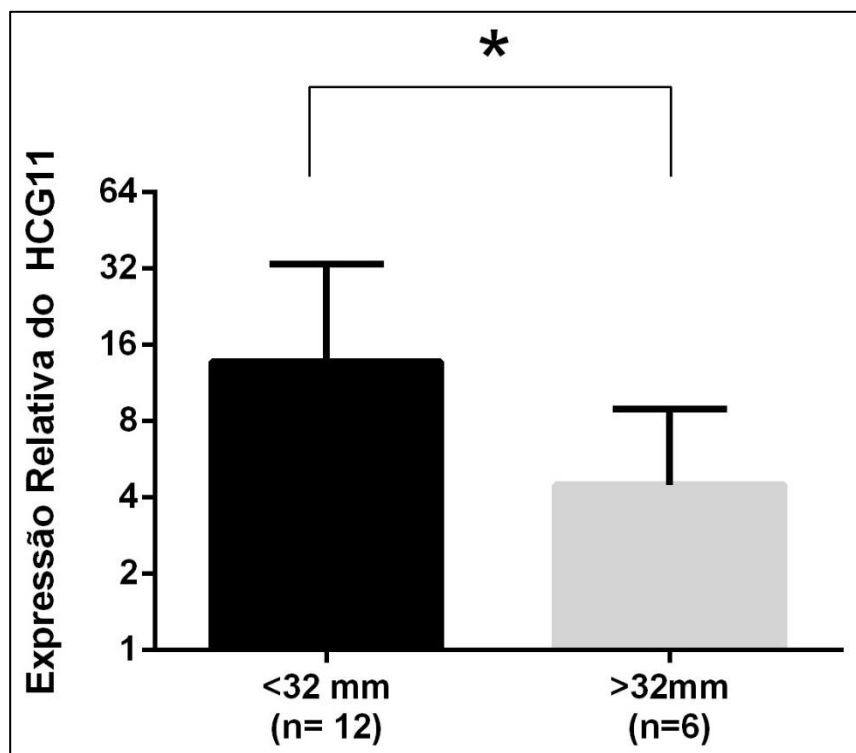
A análise da expressão do HCG11 em relação ao tamanho do tumor foi realizada avaliando a média do tamanho dos tumores. Isso possibilitou dividir as amostras em dois grupos; um grupo que apresentava tamanho do tumor menor que a média e o outro grupo que apresentava tamanho tumoral maior que a média. A análise de relação foi feita comparando os dados de expressão do HCG11 entre os 2 grupos.

Quando analisados os dados de todas as pacientes do estudo, não foi observada associação entre a expressão relativa do HCG11 e o tamanho dos tumores ( $p= 0,5$ ). Dentro do subtipo Luminal A, o tamanho do tumor também não foi associado com a expressão do HCG11. Entretanto, foi observado que entre as amostras do subtipo triplo negativo, a menor expressão do HCG11 foi associada com tumores que apresentavam tamanho maior que a média desse grupo, que foi de 32 mm ( $p=0,04$ ) (FIGURA 10).

Para verificar se a terapia neoadjuvante estava interferindo com o tamanho do tumor avaliado, foram comparados os tamanhos dos tumores das pacientes triplo

negativas submetidas ou não ao tratamento neoadjuvante. Na análise realizada não foi observada diferença estatística no tamanho dos tumores das pacientes submetidas ou não ao tratamento neoadjuvante ( $p = 0,680$ ).

FIGURA 10 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 EM RELAÇÃO AO TAMANHO DOS TUMORES DO SUBTIPO TRIPLO NEGATIVO.

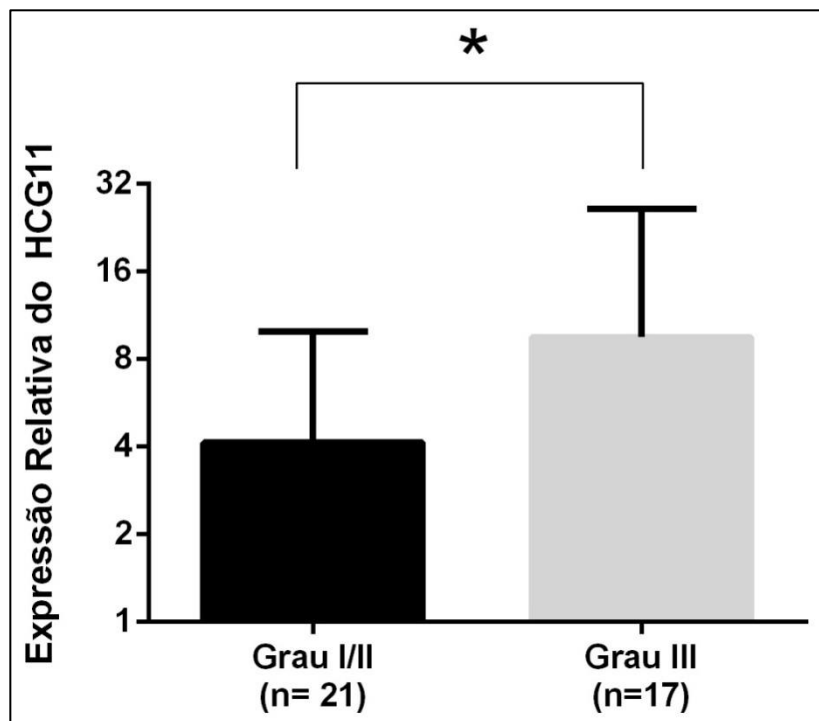


\* $p < 0,05$

FONTE: A autora (2018).

Foi observado que tumores com grau III apresentaram maior expressão do lncRNA HCG11 ( $p= 0,038$ ), quando comparados com tumores de grau I e II (FIGURA 11). Isto indica que a maior expressão desse lncRNA está associado com tumores mais agressivos.

FIGURA 11- EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 ENTRE TUMORES COM GRAU I E II E GRAU III.

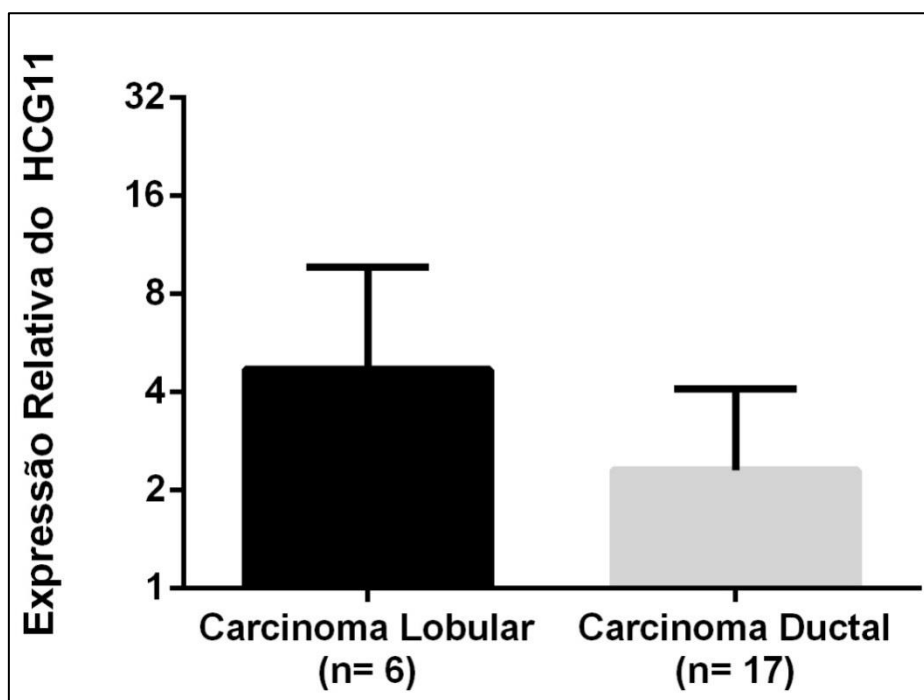


\* $p<0,05$ .

FONTE: A autora (2018)

Entre as amostras do subtipo Luminal A, 6 amostras são carcinomas lobulares e 17 amostras são carcinoma ductais. Foi avaliado se havia diferença de expressão do HCG11 entre os tumores Luminais A provenientes de diferentes tipos histológicos mamários. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p= 0,177$ ), sugerindo que a origem histológica do tumor não está relacionada com a expressão do HCG11 e que expressão dessa molécula se mantém homogênea entre o subtipo Luminal A (FIGURA 12).

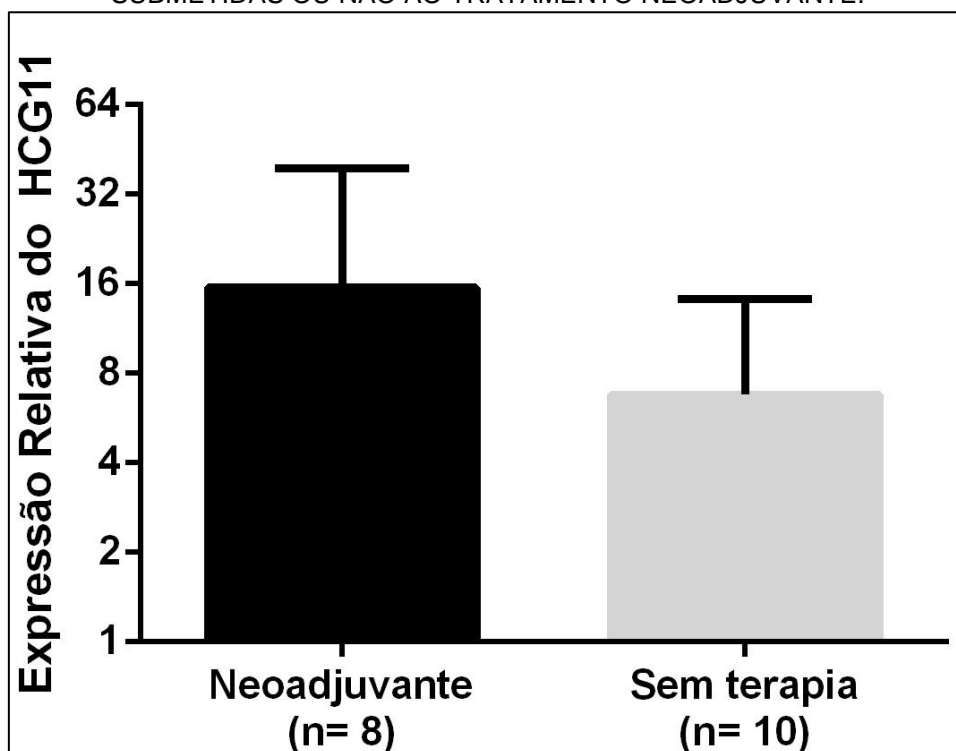
FIGURA 12 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 EM CARCINOMAS DUCTAIS E LOBULARES DE PACIENTES COM SUBTIPO LUMINAL A.



FONTE: A autora (2018)

Entre as amostras do subtipo triplo negativo, 8 pacientes foram submetidas à terapia neoadjuvante e 10 pacientes não receberam tratamento prévio à cirurgia. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,235$ ) nos níveis de expressão do HCG11 entre as pacientes com ou sem tratamento (FIGURA 13). Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão do HCG11 das pacientes triplo negativas submetidas ao tratamento neoadjuvante ( $p= 0,25$ ) e sem terapia neoadjuvante ( $p>0,99$ ). Este resultado sugere que o tratamento quimioterápico não interfere na expressão do HCG11 e que a expressão avaliada no subgrupo triplo negativo não sofreu interferência do tratamento neoadjuvante.

FIGURA 13 - EXPRESSÃO RELATIVA DO HCG11 EM AMOSTRAS TRIPLO NEGATIVAS SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO NEOADJUVANTE.



FONTE: A autora (2018)



## 6. DISCUSSÃO

Apesar dos significativos avanços no entendimento e no tratamento do carcinoma mamário nos últimos anos, a doença ainda é um grave problema de saúde pública no mundo todo. A dificuldade em entender as características clínicas e moleculares dos tumores, em elucidar os mecanismos de resistência a drogas antineoplásicas e em prevenir a recidiva e metástase da doença ainda são os maiores desafios a serem enfrentados no combate à neoplasia mamária (LUKONG *et al.*, 2017).

O câncer de mama é subdividido em diferentes subtipos, que apresentam diferenças em seu perfil de expressão gênica; em suas características clínicas, como tempo de sobrevida livre da doença, tempo total de sobrevida, potencial metastático e de invasão; na resposta a tratamentos (LUKONG *et al.*, 2017). Por apresentarem características biológicas, moleculares e clínicas tão diferentes, esses subtipos representam grupos biológicos diferentes e devem ser analisados como doenças diferentes. Ao levar em consideração que cada subtipo apresenta características exclusivas, é possível determinar os fatores de diagnóstico e de prognóstico associados a cada subtipo. Isto acarreta em diferentes formas de tratamento; a fim de fornecer tratamento personalizado para cada paciente (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013).

A classificação imunoistoquímica dos cânceres de mama é determinada através do status do receptor de estrogênio (RE), do receptor de progesterona (RP), do receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2), e do índice Ki-67; que são os marcadores biológicos mais utilizados na prática clínica e têm papéis importantes no prognóstico e resposta a métodos terapêuticos (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013). Embora esta classificação seja utilizada rotineiramente e já sejam aplicadas diferentes estratégias terapêuticas no tratamento dos pacientes com carcinoma mamário, a análise desses biomarcadores não é suficiente para englobar toda a heterogeneidade observada nos carcinomas mamários. Por exemplo, a classificação imunoistoquímica não considera a heterogeneidade dos tumores do subtipo triplo negativo. Este subtipo é o mais invasivo e apresenta o pior prognóstico; entretanto, sua classificação é dada pela ausência da expressão de outros biomarcadores, sendo realizada por exclusão. Uma vez que não existem biomarcadores específicos para esse subtipo e que esses tumores apresentam alto índice de proliferação, o tratamento é

realizado apenas com drogas citotóxicas (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013). Em muitos casos, os pacientes desenvolvem resistência aos medicamentos quimioterápicos e sofrem recidiva da doença (LI *et al.*, 2015).

Há a urgente necessidade de identificar e validar novos marcadores moleculares para tumores triplo negativos, para que possam ser estabelecidos com maior especificidade os critérios que definirão o diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes com esse subtipo. Ao melhor classificar a doença, bem como identificar novas vias de sinalização do tumor, é possível desenvolver novas formas de diagnóstico e controle da doença, além de possibilitar o desenho de novas drogas alvos para o tratamento desse subtipo, que sejam menos tóxicas e mais eficazes.

A busca por novos biomarcadores e também a necessidade de melhor entender a fisiopatologia do subtipo triplo negativo não se limita apenas aos genes codificantes de proteínas. Por exemplo, os genes não codificantes vêm demonstrando que apresentam grande significado biológico no surgimento de neoplasias. Neste contexto, destacam-se os lncRNAs, que são moléculas altamente tecido-específicas e que atuam controlando a expressão de diferentes genes (FANG; FULLWOOD, 2016). Pequenas alterações na expressão dos lncRNAs são capazes de alterar o ambiente celular, uma vez que, eles podem interferir diretamente no processo transcricional, no remodelamento de cromatina e atuar como competidores endógenos de miRNA, mRNAs, bem como interferirem na atividade de diferentes proteínas (SILVA *et al.*, 2016).

A análise dos lncRNAs, assim como de outros RNAs não codificantes, objetiva fornecer meios para identificar padrões de expressão que representem fenótipos clínicos importantes, como resistência e sensibilidade a terapias específicas, potencial metastático, tempo de sobrevida livre de doença ou tempo total de sobrevida.

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi elucidar a relação entre a expressão do lncRNA HCG11 em tumores luminais A e triplo negativos, a fim de entender como essa molécula pode estar interferindo na diferenciação destes subtipos. Além disso, foi feita também análise a fim de verificar se havia associação de características histopatológicas das pacientes com a expressão do HCG11.

O presente estudo verificou que o HCG11 é superexpresso em amostras tumorais do subtipo triplo negativo, quando comparadas com amostras tumorais do subtipo Luminal A. Além disso, também foi observado que a maior expressão do HCG11 está relacionada com tumores mais agressivos, com tumores de grau III. Entretanto, não foram encontradas associações entre a expressão diferencial do HCG11 e os outros parâmetros clínicos analisados, como invasão em linfonodos axilares, idade ou tamanho do tumor. Foi observado que dentro dos tumores triplo negativos, a maior expressão do HCG11 foi associada com tumores de menor tamanho.

Não foi observada diferença estatística entre tumores ductais e lobulares de pacientes do subtipo Luminal A, sugerindo que a origem celular do tumor não interfere na expressão do lncRNA HCG11. Também não foi evidenciada diferença estatística na expressão do HCG11 entre pacientes do subtipo triplo negativo que foram submetidas ou não ao tratamento neoadjuvante; indicando que o tratamento quimioterápico não interfere na expressão dessa molécula. Dados clínicos de metástase em linfonodos axilares e idade das pacientes não foram relacionados com a expressão diferencial do HCG11.

Foi avaliada a expressão do HCG11 em 23 amostras do subtipo Luminal A e 18 amostras triplo negativas e a ausência de associação entre com os parâmetros clínicos pode ser devido ao pequeno número amostral utilizado. Portanto, o tamanho amostral deve ser considerado como um viés do estudo, sendo necessário um número maior de amostras para uma avaliação mais precisa.

Um estudo do nosso grupo, realizado por Sugita *et al.* (2014), através da técnica de aCGH (*array Comparative Genomic Hybridization*) avaliando amostras triplo negativas e não triplo negativas, indicou que a região 6p25.3-6p11.2 apresenta aumento no número de cópias no DNA nas amostras triplo negativas, região que contém o gene que transcreve para o lncRNA HCG11. Este achado, junto com os dados do presente estudo, pode sugerir que o mecanismo pelo qual há aumento de expressão no HCG11 em amostras triplo negativas é através do aumento do número de cópias no DNA do gene *HCG11* em pacientes deste subtipo. Nosso estudo, complementa os achados do aCGH e mostra que o aumento no número de cópias dessa região é seguido do aumento na expressão desse gene, indicando que ocorre a

transcrição da região amplificada. Maiores níveis na expressão do HCG11 podem estar alterando a expressão de outras moléculas, o que pode estar interferindo com processos de divisão e controle do ciclo celular.

Análises *in silico*, utilizando dados de expressão gênica do TCGA, com pacientes com câncer de mama indicaram que há um aumento na expressão do HCG11 em amostras tumorais de mama. Foi demonstrado também que o aumento na expressão do HCG11 está relacionado com um pior prognóstico destas pacientes. Neste estudo, os autores também observaram que a alteração no nível de expressão desse lncRNA está significativamente associado com o subtipo triplo negativo. Além disso, foi evidenciado que não há alteração da expressão dessas moléculas em tumores que são positivos para o receptor de estrogênio (LIU *et al.*, 2016).

Diferentes testes *in vitro* demonstraram que o HCG11 atua no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular e que a função desse lncRNA está relacionada com a função desempenhada pela proteína IGF2BP1, que então é capaz de modular a via das MAPK e a via de apoptose mitocondrial (XU *et al.*, 2017).

Análises de GO (*Gene Ontology*) e KEGG Pathways (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) em câncer de próstata indicaram que o HCG11 pode estar envolvido em diferentes processos celulares, como na regulação da transdução de sinal, transcrição, adesão celular, desenvolvimento embrionário e fosforilação de amino ácidos. Foi evidenciado, através de análises de enriquecimento de vias, que o HCG11 pode estar atuando na via de sinalização MAPK, Jak/STAT, Wnt, e de sinalização mediada por cálcio. Através da construção de redes regulatórias, os autores observaram que o HCG11 pode atuar como competidor endógeno, em que foi demonstrado que ele atua regulando positivamente 7 miRNAs e regulando negativamente 9 mRNAs (ZHANG *et al.*, 2016).

O lncRNA HCG11 é considerado pseudogene do lncRNA NORAD e esses lncRNAs apresentam 91% de similaridade entre as suas sequências. Além disso, essas moléculas apresentam sítio conservados de ligação com as proteínas da família PUMILIO, que são proteínas de ligação à RNAs. Considerando essa similaridade, pode ser que o HCG11 desempenha funções semelhantes às desenvolvidas pelo NORAD. Foi observado que a perda de função do NORAD está relacionada com instabilidade

cromossômica. Clones celulares depletados para NORAD apresentaram tetraploidia; alteração no número de cromossomos, com ganho ou perda de cromossomos inteiros; além de alto índice de erros mitóticos (LEE *et al.*, 2017). O lncRNA NORAD age regulando negativamente a atividade de PUMILIO, impedindo que as proteínas PUMILIO se liguem aos mRNAs de seus alvos e degrade-os (TICHON *et al.*, 2016). Como esses lncRNAs apresentam vários sítios de ligação para a PUMILIO (LEE *et al.*, 2017), pode-se sugerir que a função desempenhada pelo HCG11 seja similar a desenvolvida pelo NORAD.

O HCG11 é pouco expresso nas células (TICHON *et al.*, 2016), o que diminui as chances de atuarem como reguladores das proteínas PUMILIO no ambiente citoplasmático. Entretanto pequenas alterações na expressão desse lncRNA podem causar alterações significativas na atividade dessas proteínas e causar um desbalanço na homeostase celular, uma vez que o HCG11 tem vários sítios para ligação com as proteínas PUMILIO. Desse modo, o aumento nos níveis de expressão do HCG11 nas células cancerosas pode estar fazendo com que esse lncRNA esteja mais disponível no citoplasma e atue inibindo as proteínas PUMILIO. Futuros estudos são necessários para determinar a localização celular do HCG11 no câncer de mama, a fim de avaliar se ocorre apenas o aumento da expressão dessa molécula ou se também ocorre mudança da localização celular, o que interfere diretamente no mecanismo de controle desempenhado pelo lncRNA. Além disso, também é necessário analisar se o aumento da expressão do HCG11 no subtipo triplo negativo causa inibição das proteínas PUMILIO e, conseqüentemente, aumento na expressão de seus alvos.

Um estudo realizado por Pereira (2018) demonstrou que o NORAD não está significativamente mais expresso em amostras triplo negativas, quando comparado com os outros subtipos. Entretanto, foi observado aumento significativo dos alvos da PUMILIO nas amostras triplo negativas, sugerindo que há outros mecanismos de controle envolvidos nessa via. Uma vez que o HCG11 está superexpresso em amostras triplo negativas e pode estar interagindo com a atividade das proteínas PUMILIO, pode ser que o aumento de expressão nos alvos de PUMILIO sejam devido a inibição gerada pelo lncRNA HCG11 (PEREIRA, 2018).

O presente estudo observou que tumores triplo negativos apresentam maiores níveis de expressão do HCG11, corroborando com o estudo de Liu *et al.* (2016), em que foi observado que o lncRNA HCG11 está superexpresso em amostras tumorais de mama. Entretanto, nos tumores de próstata a diminuição nos níveis de expressão dessa molécula foi relacionada com um pior prognóstico dos pacientes, bem como menor tempo de recidiva (ZHANG *et al.*, 2016). Portanto, a alteração na expressão dessa molécula parece ser tumor específica.

Por apresentar especificidade em relação ao tumor avaliado, o HCG11 poderia ser utilizado como um biomarcador tumoral. Especialmente no caso de tumores triplo negativos, que não apresentam marcadores específicos, o HCG11 poderia ser investigado como um possível biomarcador de prognóstico, diagnóstico ou futuro alvo terapêutico no tratamento desse subtipo. O tratamento de tumores triplo negativos é realizado com agentes citotóxicos, que carecem de especificidade para agir somente nas células tumorais. Como o HCG11 é pouco expresso em células normais e apresenta-se superexpresso nas células de tumores triplo negativos, novas terapias que inibissem essa molécula poderiam ter alto poder terapêutico e poucos efeitos colaterais.

Tumores triplo negativos apresentam o pior prognóstico entre os subtipos do câncer de mama, apresentando alto poder de invasão e capacidade de formar metástases à distância. Os mecanismos que estão relacionados com esse fenótipo ainda não estão completamente elucidados, por isso é importante determinar quais as moléculas estão associadas com esse subtipo, para então entender melhor a fisiopatologia desse subtipo tão agressivo. Os resultados desse estudo indicaram que o HCG11 tem sua expressão aumentada nesse subtipo, sugerindo que a expressão diferencial desse lncRNA pode estar relacionada com as características observadas em tumores triplo negativos, além de poder estar envolvido em diversas vias importantes para o surgimento desses tumores.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo observou que tumores triplo negativos apresentam maiores níveis de expressão do lncRNA HCG11, quando comparadas com tumores do subtipo Luminal A. Também foi demonstrado que maiores níveis dessa molécula foram associados com tumores de graus histológicos mais avançados. Parâmetros clínicos como idade e presença de metástase em linfonodos axilares não foi associado com diferentes níveis de expressão do HCG11. Dentre as amostras do subtipo Luminal A, não foi observada expressão diferencial entre Carcinomas Ductais e Carcinomas Lobulares.

Entre as pacientes com o subtipo triplo negativo, foi demonstrado que o tratamento neoadjuvante não interferiu com a expressão do lncRNA HCG11. No entanto, foi observado que os tumores de maior tamanho expressavam menores níveis de HCG11. Os resultados do presente estudo sugerem a especificidade dessa molécula em relação ao subtipo triplo negativo e postulam a possível utilização do HCG11 como um futuro biomarcador de prognóstico e diagnóstico para pacientes e também um possível alvo terapêutico para pacientes do subtipo triplo negativo. Futuros estudos são necessários para entender os mecanismos pelo qual o lncRNA HCG11 está envolvido na biologia tumoral do câncer de mama, bem como entender o seu papel na fisiopatologia dos tumores triplo negativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDUCCI, L.; AAPRO, M. Epidemiology of Cancer and Aging. **Cancer Treatment and Research**, p. 1-15, 2005.

BECKER, S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, p. S36-S39, 2015.

BOHN, J.; VAN ETEN, J.; SCHAGAT, T. et al. Identification of diverse target RNAs that are functionally regulated by human Pumilio proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 362-386, 2017.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CERK, S.; SCHWARZENBACHER, D.; ADIPRASITO, J. et al. Current Status of Long Non-Coding RNAs in Human Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1485, 2016.

CHEN, Y.; LIU, Y.; WEI, H.; LV, K.; FU, P. Linc-ROR induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to drug resistance and invasion of breast cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 8, p. 10861-10870, 2016.

CIPOLLA, G.; DE OLIVEIRA, J.; SALVIANO-SILVA, A.; LOBO-ALVES, S.; LEMOS, D.; OLIVEIRA, L.; JUCOSKI, T.; MATHIAS, C.; PEDROSO, G., ZAMBALDE, E.; GRADIA, D. Long Non-CodingRNAs in MultifactorialDiseases: AnotherLayerofComplexity. **Non-Coding RNA**, v. 4, n. 2, p. 13, 2018.

CLARK, M. B.; JOHNSTON, R. L.; INOSTROZA-PONTA, M.; FOX, A. H.; FORTINI, E.; MOSCATO, P.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. **Genome Research**, v. 22, n. 5, p. 885-898, 2012.

DERRIEN, T.; JOHNSON, R.; BUSSOTTI, G. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1775-1789, 2012.

DJEBALI, S.; DAVIS, C.; MERKEL, A. et al. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101-108, 2012.

DUSZCZYK, M.; WUTZ, A.; RYBIN, V.; SATTLER, M. The Xist RNA A-repeat comprises a novel AUCG tetraloop fold and a platform for multimerization. **RNA**, v. 17, n. 11, p. 1973-1982, 2011.



FANG, Y.; FULLWOOD, M. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 42-54, 2016.

FATICA, A.; BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 1, p. 7-21, 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2014.

FERZOCO, R.; RUDDY, K. The Epidemiology of Male Breast Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 1, 2015.

GALGANO, A.; FORRER, M.; JASKIEWICZ, L. et al. Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF-Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the miRNA Regulatory System. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3164, 2008.

GEDDES, D. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 52, n. 6, p. 556-563, 2007.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.; COATES, A. et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736-1747, 2011.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E.; COATES, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206-2223, 2013.

GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, E.; GARCÍA, P.; AGUILAR, M.; PADILLA, C.; ÁLVAREZ, J. Breastfeeding and the prevention of breast cancer: a retrospective review of clinical histories. **Journal of Clinical Nursing**, v. 23, n. 17-18, p. 2397-2403, 2013.

GRADIA, D.; MATHIAS, C.; COUTINHO, R. et al. Long Non-Coding RNA TUG1 Expression Is Associated with Different Subtypes in Human Breast Cancer. **Non-Coding RNA**, v. 3, n. 4, p. 26, 2017.

GUPTA, R.; SHAH, N.; WANG, K. et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071-1076, 2010.

GUTTMAN, M.; AMIT, I.; GARBER, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 223-227, 2009.

HUANG, G.; KE, Z.; HU, H.; GU, B. Co-expression network analysis of long noncoding RNAs (lncRNAs) and cancer genes reveals SFTA1P and CASC2 abnormalities in lung squamous cell carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 18, n. 2, p. 115-122, 2017.

HONDERMARCK, H. Breast Cancer. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 281-291, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HEWARD, J.; LINDSAY, M. Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 9, p. 408-419, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - Estimativa de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 01/ 06/ 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – Fatores de Risco. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores\\_de\\_risco\\_1](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1)>. Acesso em: 11/ 05/ 2018.

IVKOVIC-KAPICL, T.; KNEZEVIC-USAJ, S.; PANJKOVIC, M.; NINCIC, D.; MASTILOVIC, K. The influence of aging on pathologic and immunobiologic parameters of invasive ductal breast carcinoma. **Vojnosanitetski pregled**, v. 63, n. 11, p. 921-927, 2006.

KAWAKAMI, T.; ZHANG, C.; TANIGUCHI, T., KIM, C. J., OKADA, Y., SUGIHARA, H., HATTORI, T., REEVE, A. E., OGAWA, O. AND OKAMOTO, K. Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female-derived cancer cells. **Oncogene**, v. 23, n. 36, p. 6163-6169, 2004.

KAPRANOV, P.; CHENG, J.; DIKE, S.; NIX, D.A.; DUTTAGUPTA, R.; WILLINGHAM, A.T.; STADLER, P.F. *et al.* RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. **Science**, v. 316, p. 1484–1488, 2007.

KEDDE, M.; VAN KOUWENHOVE, M.; ZWART, W. *et al.* A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 10, p. 1014-1020, 2010.

KHALIL, A.; GUTTMAN, M.; HUARTE, M.; GARBER, M.; RAJ, A.; RIVEA MORALES, D.; THOMAS, K. *et al.* Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 28, p. 11667-11672, 2009

KIM, J.; KIM, K.; NOH, J. et al. Long noncoding RNAs in diseases of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1859, n. 1, p. 209-221, 2016.

KUNG, J.; COLOGNORI, D.; LEE, J. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics*, v. 193, n. 3, p. 651-669, 2013.

LAKHANI, S.; VAN DE VIJVER, M.; JACQUEMIER, J.; ANDERSON, T. J.; OSIN, P. P.; MCGUFFOG, L.; EASTON, D. F. The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and p53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 9, p. 2310-2318, 2002.

LANDER, E.; LINTON, L.; BIRREN, B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LAW, J.; JACOBSEN, S. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 3, p. 204-220, 2010.

LEEPER, T.; VARANI, G. The structure of an enzyme-activating fragment of human telomerase RNA. *RNA*, v. 11, n. 4, p. 394-403, 2005.

LI, X.; ZHA, Q.; REN, Z.; TANG, J.; YAO, Y. Mechanisms of breast cancer resistance to anthracyclines or taxanes. *Current Opinion in Oncology*, v. 27, n. 6, p. 457-465, 2015.

LI, W.; ZHAI, L.; WANG, H.; LIU, C.; ZHANG, J.; CHEN, W.; WEI, Q. Downregulation of LncRNA GAS5 causes trastuzumab resistance in breast cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 19, 2016.

LI, Y.; WANG, B.; LAI, H. et al. Long non-coding RNA CRALA is associated with poor response to chemotherapy in primary breast cancer. *Thoracic Cancer*, v. 8, n. 6, p. 582-591, 2017.

LI, T.; LIU, Y.; XIAO, H.; XU, G. Long non-coding RNA TUG1 promotes cell proliferation and metastasis in human breast cancer. *Breast Cancer*, v. 24, n. 4, p. 535-543, 2016.

LIU, H.; LI, J.; KOIRALA, P. et al. Long non-coding RNAs as prognostic markers in human breast cancer. *Oncotarget*, v. 7, n. 15, 2016.

LEE, S.; KOPP, F.; CHANG, T. et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell*, v. 164, n. 1-2, p. 69-80, 2016.

LUKONG, K. Understanding breast cancer – The long and winding road. *BBA Clinical*, v. 7, p. 64-77, 2017.

MA, L.; BAJIC, V.; ZHANG, Z. On the classification of long non-coding RNAs. **RNA Biology**, v. 10, n. 6, p. 924-933, 2013

MA, P.; XU, T.; HUANG, M.; SHU, Y. Increased expression of LncRNA PANDAR predicts a poor prognosis in gastric cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 172-176, 2016.

MERCER, T.; MATTICK, J. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 3, p. 300-307, 2013.

MILES, W.; TSCHOP, K.; HERR, A.; JI, J.; DYSON, N. Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene. **Genes & Development**, v. 26, n. 4, p. 356-368, 2012.

NING, S.; GAO, Y.; WANG, P. Construction of a lncRNA-mediated feed-forward loop network reveals global topological features and prognostic motifs in human cancers. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, 2016.

NOVIKOVA, I.; HENNELLY, S.; SANBONMATSU, K. Structural architecture of the human long non-coding RNA, steroid receptor RNA activator. **NucleicAcidsResearch**, v. 40, n. 11, p. 5034-5051, 2012.

Organização Mundial da Saúde (OMS).WHO Cancer Fact Sheets. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.

PARSA, Y.; MIRMALEK, S.; ELHAM KANI, F. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. **Electronic physician**, v. 8, n. 5, p. 2416-2424, 2016.

PASTORI, C.; WAHLESTEDT, C. Involvement of long noncoding RNAs in diseases affecting the central nervous system. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p. 860-870, 2012.

PAULI, A.; RINN, J.; SCHIER, A. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 136-149, 2011.

PANG, K.; FRITH, M.; MATTICK, J. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2006.

PENG, W.; FAN, H. Long non-coding RNA PANDAR correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. **Biomedicine&Pharmacotherapy**, v. 72, p. 113-118, 2015.

PEREIRA, G.A.P. **Análise da expressão do lncRNA NORAD em diferentes subtipos tumorais de carcinoma mamário**. 101f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/47393/R%20-%20D%20>>

%20GABRIELLE%20ARAUJO%20DO%20NASCIMENTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 25/11/2018.

PEROU, C.; SØRLIE, T.; EISEN, M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PICKARD, M.; MOURTADA-MAARABOUNI, M.; WILLIAMS, G. Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 10, p. 1613-1623, 2013

PONTING, C.; OLIVER, P.; REIK, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 629-641, 2009.

PRAT, A.; PARKER, J.; KARGINOVA, O. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, 2010.

PRENTICE, R.; CAAN, B.; CHLEBOWSKI, R. Low-Fat Dietary Pattern and Risk of Invasive Breast Cancer:the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. **JAMA**, v. 295, n. 6, p. 629-642, 2006.

QUINN, J.; CHANG, H. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 47-62, 2016.

SANA, J.; FALTEJSKOVA, P.; SVOBODA, M.; SLABY, O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 103, 2012.

SATPATHY, A.; CHANG, H. Long Noncoding RNA in Hematopoiesis and Immunity. **Immunity**, v. 42, n. 5, p. 792-804, 2015.

SCHMIDT, L.; SPIEKER, T.; KOSCHMIEDER, S.; HUMBERG, J.; JUNGEN, D.; BULK, E.; HASCHER, A.; WITTMER, D.; MARRA, A.; HILLEJAN, L.; WIEBE, K.; BERDEL, W. E.; WIEWRODT, R.; MULLER-TIDOW, C. The Long Noncoding MALAT-1 RNA Indicates a Poor Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer and Induces Migration and Tumor Growth. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 6, n. 12, p. 1984-1992, 2011.

SCHONROCK, N.; HARVEY, R.; MATTICK, J. Long Noncoding RNAs in Cardiac Development and Pathophysiology. **Circulation Research**, v. 111, n. 10, p. 1349-1362, 2012.

SCHWARZENBACHER, D.; BALIC, M.; PICHLER, M. The Role of MicroRNAs in Breast Cancer Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14712-14723, 2013.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SILVA, A.; BULLOCK, M.; CALIN, G. The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer. **Cancers**, v. 7, n. 4, p. 2169-2182, 2015.

SORLIE, T.; PEROU, C.; TIBSHIRANI, R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

ST. LAURENT, G.; WAHLESTEDT, C.; KAPRANOV, P. The Landscape of long noncoding RNA classification. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 5, p. 239-251, 2015.

SUGITA, B.M. **Análise integrada do padrão de expressão de microRNAs e alteração do número de cópias de DNA em tumores de mama Triplo-Negativos**. 116f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/37077/R%20-%20D%20%20BRUNA%20MAYUMI%20SUGITA.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 25/11/2018.

THEIMER, C.; BLOIS, C.; FEIGON, J. Structure of the Human Telomerase RNA Pseudoknot Reveals Conserved Tertiary Interactions Essential for Function. **Molecular Cell**, v. 17, n. 5, p. 671-682, 2005.

THOMAS, J.; OHTSUKA, M.; PICHLER, M.; LING, H. MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28063-28076, 2015.

TICHON, A.; GIL, N.; LUBELSKY, Y. et al. A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 2016.

TORIO, C.; KLASSEN, A.; CURRIERO, F.; CABALLERO, B.; HELZLSOUER, K. The Modifying Effect of Social Class on the Relationship Between Body Mass Index and Breast Cancer Incidence. **American Journal of Public Health**, v. 100, n. 1, p. 146-151, 2010.

TSAI, M.; MANOR, O.; WAN, Y.; MOSAMMAPARAST, N.; WANG, J. K.; LAN, F.; SHI, Y.; SEGAL, E.; CHANG, H.Y. Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. **Science**, v. 329, n. 5992, p. 689-693, 2010.

TRIPATHI, V.; ELLIS, J.; SHEN, Z.; SONG, D. Y.; PAN, Q.; WATT, A. T.; FREIER, S. M.; BENNETT, C. F.; SHARMA, A.; BUBULYA, P. A.; BLENCOWE, B. J.; PRASANTH,

S. G.; PRASANTH, K. V. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 39, n. 6, p. 925-938, 2010.

TRIPATHI, V.; SHEN, Z.; CHAKRABORTY, A.; GIRI, S.; FREIER, S. M.; WU, X.; ZHANG, Y.; GOROSPE, M.; PRASANTH, S. G.; LAL, A.; PRASANTH, K. V. Long Noncoding RNA MALAT1 Controls Cell Cycle Progression by Regulating the Expression of Oncogenic Transcription Factor B-MYB. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003368, 2013.

TYE, C.; GORDON, J.; MARTIN-BULEY, L. Could lncRNAs be the Missing Links in Control of Mesenchymal Stem Cell Differentiation? **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 3, p. 526-534, 2014.

VIKRAM, R.; RAMACHANDRAN, R.; ABDUL, K. Functional significance of long non-coding RNAs in breast cancer. **Breast Cancer**, v. 21, n. 5, p. 515-521, 2014.

XU, S.; SUI, J.; YANG, S. et al. Integrative analysis of competing endogenous RNA network focusing on long noncoding RNA associated with progression of cutaneous melanoma. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 4, p. 1019-1029, 2017.

XU, Y.; ZHENG, Y.; LIU, H.; LI, T. Modulation of IGF2BP1 by long non-coding RNA HCG11 suppresses apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via MAPK signaling transduction. **International Journal of Oncology**, v. 51, n. 3, p. 791-800, 2017.

WAN, Y.; QU, K.; OUYANG, Z.; KERTESZ, M.; LI, J.; TIBSHIRANI, R.; MAKINO, D.; NUTTER, R.; SEGAL, E.; CHANG, H. Genome-wide Measurement of RNA Folding Energies. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, p. 169-181, 2012.

WANG, K.; CHANG, H. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. **Molecular Cell**, v. 43, n. 6, p. 904-914, 2011.

WANG, X.; MCLACHLAN, J.; ZAMORE, P.; HALL, T. Modular Recognition of RNA by a Human Pumilio-Homology Domain. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 501-512, 2002.

WU, X.; WANG, X.; WU, W.; HU, Y.; LI, M.; DING, Q.; WENG, H.; SHU, Y.; LIU, T.; JIANG, L.; CAO, Y.; BAO, R.; MU, J.; TAN, Z.; TAO, F.; LIU, Y. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, n. 6, p. 806-814, 2014.

YING, L.; CHEN, Q.; WANG, Y.; ZHOU, Z.; HUANG, Y.; QIU, F. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 9, p. 2289, 2012.

ZHANG, H.; CAI, K.; WANG, J.; WANG, X.; CHENG, K.; SHI, F.; JIANG, L.; ZHANG, Y.; DOU, J. MiR-7, Inhibited Indirectly by LincRNA HOTAIR, Directly Inhibits SETDB1 and Reverses the EMT of Breast Cancer Stem Cells by Downregulating the STAT3 Pathway. **STEM CELLS**, v. 32, n. 11, p. 2858-2868, 2014.

ZHANG, P.; ZHOU, H.; LU, K. et al. Exosome-mediated delivery of MALAT1 induces cell proliferation in breast cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 11, p. 291-299, 2018.

ZHANG, Y.; WANG, T.; HUANG, H.Q.; LI, W.; CHENG, X.L.; YANG, J. Human MALAT-1 long non-coding RNA is overexpressed in cervical cancer metastasis and promotes cell proliferation, invasion and migration. **J. BUON**, v. 20, p. 1497–1503, 2015.

ZHANG, Y.; ZHANG, P.; WAN, X. et al. Downregulation of long non-coding RNA HCG11 predicts a poor prognosis in prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 936-941, 2016.

ZHENG, H. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, 2017.

ZHU, H.; BAI, W.; YE, X.; YANG, A.; JIA, L. Long non-coding RNA UCA1 desensitizes breast cancer cells to trastuzumab by impeding miR-18a repression of Yes-associated protein 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 4, p. 1308-1313, 2018.

ZHU, Q.; WANG, G.; GUO, Y.; ZHANG, R.; DENG, J.; LI, Z.; ZHU, Y. LncRNA H19 is a major mediator of doxorubicin chemoresistance in breast cancer cells through a cullin4A-MDR1 pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 54, 2017.